

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Efecto de las bajas temperaturas durante una noche
sobre los glúcidos de reserva de la inflorescencia de la
vid (*Vitis vinifera* L.) CV. "Pinot Noir"**

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTORA:

Vanessa Céliz Mendiola

ASESORES:

Margarita Rosa Eugenia Velásquez Reinoso,

Cedric Jacquard

Lima, Perú

2011

Dedicatoria:

***A mi madre, ELIZABETH y a mi
abuela, AMABLE VICTORIA.***

Por su amor y apoyo incondicional.

Las amo y las amaré siempre.

***A todos los que luchando por sus sueños
llegan a perder el camino... pero nunca
olvidan sus ideales.***

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quisiera agradecer a mi asesora y madrina, Blga. Margarita Rosa Eugenia Velasquez Reinoso. O como sus alumnos le decimos: "Profa Maggie". Siempre supe que Ud. era la persona en quién debía confiar el difícil (¿o fácil?) trabajo de asesorarme en la tesis. Gracias por entender, leer y responder todos mis correos a 7 horas de diferencia horaria. Gracias por defenderme y hacer la lucha que yo misma no podía hacer por no estar en Perú durante la realización de este trabajo. Gracias desde el principio hasta el final, desde mucho antes de ser mi asesora, hasta ahora poder tener el honor de decirme su colega. Muchas gracias Madri!

A mi madre, por ser la mejor madre del mundo. Por hacerme aprender la lección en el colegio y querer que siempre sea la mejor. Hiciste bien tu trabajo mami: ahora tengo una vena de responsabilidad y de orgullo por un trabajo bien hecho que no me la quita nadie. Este trabajo es fruto de nuestra perseverancia. La mía, y la tuya.

A mi abuela, por hacerme Mendiola de apellido y Tello por los genes. Por darme un modelo de fuerza, constancia y lucha a seguir. Por darme el balance de independencia y autonomía que ahora tengo en mi vida. Por ser tan previsiva, metódica y terca. Por las visitas imprevistas a la facultad para dejar mis papeles de la tesis. Por apoyar a tus nietas de manera incondicional.

ACKNOWLEDGMENTS

This time in English I want to thank Pr Chisthophe CLEMENT and Dr Cédric JACQUARD for giving me the chance to enter their lab group at Rheims.

Cédric, maybe you don't speak Spanish, and might as well never read the whole of this masterpiece of work ;) but that doesn't mean I am not absolutely thankful with you. Because this "masterpiece of work" couldn't have been done without your help. Since my arrival at the lab you helped and oriented me, it was my first time as an intern in France, so I was really, really nervous. However, you were awesome. Thanks for your guidance in my French work and for accepting helping me with this work for my country. You said "Yes!" without doubts. I am happy to say that in spite of everything, I met great people at Rheims. MERCI MERCI MERCI!

Finally, I want to thank Etienne Jeanson for helping me getting through my first master's internship, for teaching me all I needed to know about the lab work, for being so patient during the long hours of hard work and for helping me with part of this amazing grapevine work.

INDICE GENERAL

	Página
CARATULA	I
ACTA DE SUSTENTACION	II
CONTRACARATULA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ACKNOWLEDGMENTS	VI
INDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMEN / ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEORICO	7
2.1 La Vid	7
2.1.1 Morfología de la Vid	7
2.1.1.1 Las raíces	7
2.1.1.2 El tronco y las ramas	9
2.1.1.3 Las hojas y los zarcillos	10
2.1.1.4 La inflorescencia, la flor y el fruto	10
2.1.2 Ciclo de desarrollo	12
2.1.2.1 Generalidades	12
2.1.2.2 Ciclo vegetativo de la Vid	16

2.1.2.3 Ciclo reproductor: la floración en la Vid	18
2.1.2.4 Factores que afectan la floración	24
2.2 Efectos del estrés causado por el frío en la vid	25
2.2.1 Generalidades	25
2.2.2 Efectos en la fotosíntesis y el metabolismo del carbono	26
2.2.3 La “Coulure”	27
2.3 Los glúcidos	30
2.3.1 El metabolismo del carbono	30
2.3.2 Importancia de los glúcidos en la floración en la vid	33
2.3.2.1 Movilización de azúcares desde las reservas	35
2.3.2.2 Fotosíntesis foliar	36
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	38
4. MATERIALES Y METODOS	39
4.1 Material vegetal	39
4.1.1 Origen del material vegetal	39
4.1.2 Características de la cepa	39
4.1.3 Obtención de ramas fructíferas	39
4.2 Material de laboratorio: equipos, reactivos y otros	42
4.2.1 Equipos	42
4.2.2 Reactivos	42
4.2.3 Otros	43
4.3 Métodos de trabajo	43
4.3.1 Exposición a bajas temperaturas	43
4.3.2 Cuantificación de glúcidos	44
4.3.2.1 Cuantificación de almidón	44
4.3.2.2 Cuantificación de glúcidos solubles	45

4.3.3	Observación y localización de reservas amiláceas mediante preparaciones microscópicas	47
4.3.4	Pruebas estadísticas	49
5.	RESULTADOS	50
5.1	Cuantificación de Glúcidos	50
5.1.1	Glucosa	50
5.1.2	Fructosa	52
5.1.3	Sacarosa	52
5.1.4	Almidón	54
5.2	Observación y localización de reservas amiláceas	54
6.	DISCUSION	57
6.1	De la importancia y la variabilidad de las reservas en glúcidos de las estacas	57
6.2	De la cuantificación de glúcidos	58
6.2.1	Respuesta a 4°C	58
6.2.2	Respuesta a 0°C	59
6.2.3	Respuesta a -3°C	60
6.3	De la observación y localización de reservas amiláceas	62
6.4	Del efecto global de un estrés a “-3°C”	63
7.	CONCLUSIONES	65
8.	RECOMENDACIONES	66
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68
10.	ANEXOS	74
10.1	Anexo 1	74
10.2	Anexo 2	76
11.	GLOSARIO	77

ABREVIATURAS

ARS	Agricultural Research Service
BBCH	Escala de estadios fenológicos: Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry
CAMA	Cumbres Andinas Mendoza Argentina
Fig.	Figura
G3P	Gliceraldehído-3-Fosfato
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida
ADP	Adenosín Difosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
Pág.	Página
RubisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5 Bifosfato
USDA	United States Department of Agriculture

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Plano de las cuatro zonas de viñedos de la región Champagne	2
Figura 2: Cepas cultivadas en el viñedo Champenois	3
Figura 3: Partes de la vid	8
Figura 4: Partes de un sarmiento de vid	9
Figura 5: Partes de una inflorescencia de vid	11
Figura 6: Diagrama floral de la vid	12
Figura 7: Ciclo de desarrollo de la vid según las estaciones	13
Figura 8: Estadíos fenológicos de la vid	15
Figura 9: Los “lloros” de la vid	16
Figura 10: Ciclo del desarrollo reproductivo de la vid a lo largo de dos años consecutivos	18
Figura 11: Vías de desarrollo del Anlagen	20
Figura 12: Inflorescencia de la vid	22
Figura 13: Determinación del estadio de desarrollo en los cultivares Pinot noir (PN) y Gerwurztraminer (GW)	23
Figura 14: Efectos de un corto estrés debido al frío o la oscuridad o a la luz	27
Figura 15: Localización y funciones de los órganos fuente y los órganos sumideros en la vid	31
Figura 16: Esquema general de las relaciones fuente/sumidero en la vid según su ciclo anual	35

Figura 17: Fluctuaciones de las reservas y de la fotosíntesis en la vid durante un ciclo anual	36
Figura 18: Obtención de ramas fructíferas	40
Figura 19: Expresión en porcentaje de materia fresca (MF) de las concentraciones de glucosa y fructosa en las inflorescencias de las plantas control y de las plantas bajo estrés a 4°C, 0°C y -3°C en función del momento de evaluación post-estrés (2, 24 y 48 horas)	51
Figura 20: Expresión en porcentaje de materia fresca (% MF) de las concentraciones de sacarosa y almidón en las inflorescencias de las plantas control y de las plantas bajo estrés a 4°C, 0°C y -3°C en función del momento de evaluación post-estrés (2, 24 y 48 horas)	53
Figura 21: Secciones longitudinales de las inflorescencias (A) control y (B), (C) bajo estrés a -3°C, entre los estadíos BBCH 55 + 2 días y 55 + 8 días, coloreadas con azul de toluidina	55
Figura 22: Secciones longitudinales de las inflorescencias (A) control y (B) bajo estrés a -3°C, entre los estadíos BBCH 55 + 2 días y 55 + 8 días, coloreadas al ácido peryódico de Schiff	56

RESUMEN

La exposición de las plantas de vid a bajas temperaturas es uno de los factores que provocan la “*coulure*”. Este fenómeno involucra la aparición de perturbaciones a nivel de la fotosíntesis y el metabolismo del carbono de la planta. Con el fin de analizar el efecto de una noche fría sobre el contenido de los azúcares de reserva de las inflorescencias de Pinot noir, se expusieron ramas fructíferas de esta cepa de vid a temperaturas de 4°, 0° y -3°C durante una noche, para posteriormente determinar el contenido de glúcidos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) de las inflorescencias. En paralelo, se realizaron observaciones microscópicas de las reservas amiláceas de las inflorescencias sometidas a una noche a -3°C. Los resultados de este estudio muestran que los contenidos en glucosa y fructosa de las inflorescencias fluctúan durante las primeras horas luego de un estrés de 4° y 0°C. Sin embargo, es sobre todo luego de una noche a -3°C que se pudo constatar una fuerte movilización y consumo de los azúcares de reserva contenidos en las inflorescencias estresadas.

Palabras clave: Estrés frío, glúcidos, inflorescencia, vid, coulure.

ABSTRACT

Exposure to low temperatures is one of the main factors causing the coulure in grapevine, due to its effect on the plant's photosynthesis and carbon metabolism. To test the effect of a chilling night on carbon reserves of inflorescences of Pinot Noir, fruiting cuttings that have undergone a low-temperature night at 4°, 0° and -3 ° C were used to determine the levels of carbohydrates (glucose, fructose, sucrose and starch) in the inflorescences. Microscopic observations of inflorescences after a -3 ° C night were performed. The levels of glucose and fructose fluctuated during the first hours after a 4 and 0 ° C night, but it is especially after a chilling night at -3 ° C that a strong mobilization and consumption of carbohydrates in the inflorescence were observed.

Key words: Cold stress, carbohydrates, inflorescence, grapevine, coulure.

1. INTRODUCCION

La historia de la vid, y por ende, del vino, es tan antigua que se confunde con la historia del Hombre. Esto debido a que dicha planta así como el elixir que se obtiene de ella han representado elementos importantes dentro de las sociedades occidentales, íntimamente ligados a sus economías y sus culturas.

La vid silvestre o *Vitis vinifera* L. *subsp. sylvestris* (USDA 2010) apareció hace unos 6 000 años antes de nuestra era en la región caucásica y de Mesopotamia. Tres mil años más tarde, la vid fue cultivada en Egipto y Fenicia. Esta vid cultivada o *Vitis vinifera* L. *subsp. vinifera* (USDA 2010) pasó por Grecia, Italia, Sicilia, África del Norte, España y Portugal para finalmente llegar al sur de Francia hace unos 1 000 – 500 años antes de la era actual, justamente como consecuencia de la romanización de la Galia (CAMA 2011).

Actualmente, la vid se cultiva generalmente en zonas templadas alrededor del mundo y existen más de 6 000 cultivares, de los cuales unos 50 se han encontrado en Francia (FranceAgriMer 2010). En el Perú, ocho cultivares son de gran interés por su utilización en la fabricación del Pisco (CITEvid 2004) y 16 en la exportación de uva de mesa (Velásquez 2008).

El cultivo de la vid se utiliza para la producción de vino, de fruta fresca (uva de mesa) y frutos secos (pasas) así como para la obtención de otros productos derivados tales como el jugo de uva, el etanol, el vinagre, el aceite de pepitas de uva, el ácido tártrico y los fertilizantes (Carmona *et al.* 2008). En nuestro país la uva se cultiva básicamente para la producción de uva de mesa, ya sea para el mercado nacional o para exportación, así como para la producción de vinos y pisco. Los beneficios para la salud de algunos compuestos antioxidantes como los polifenoles y el resveratrol, derivados de la uva, son cada vez más tomados en cuenta para ser utilizados en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Carmona *et al.* 2008).

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) en el 2008 la superficie agrícola destinada a la viticultura se extendió por más de 7.7 millones de hectáreas en el mundo entero, de las cuales 60% corresponden al continente europeo y cerca del 13% al continente Americano. En Francia, los viñedos cubren alrededor de 852 000 hectáreas y, en particular, la región Champagne – Ardenne posee más de 33 000 hectáreas destinadas al cultivo de la vid y la producción de *champagne* (Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, 2009) (Fig.1).

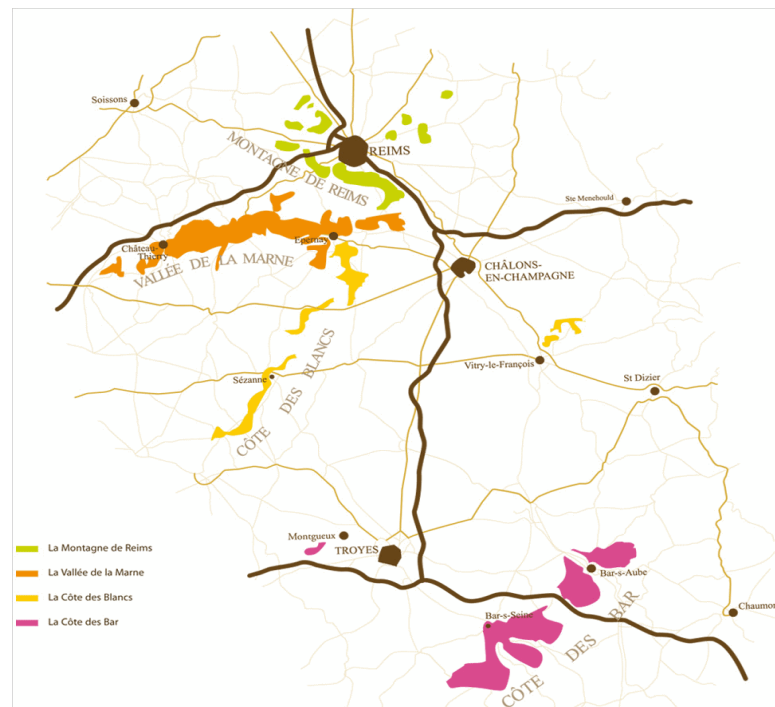


Figura 1: Plano de las cuatro zonas de viñedos de la región Champagne: La Montaña de Reims, el Valle de la Marne, la Costa des Blancs y la Costa des Bar (Tomado de *Les Champagnes de Vignerons*).

Debido a que la región se centra en la producción de *champagne*, se requieren de tres tipos principales de cepas o cultivares de uva para poder producir esta bebida: el Pinot noir, el Chardonnay y el Pinot meunier (Fig. 2). Cada una de ellas representa alrededor de un tercio de la superficie cultivable de vid en la región. Realmente, 38% de los viñedos son destinados al cultivo de la cepa Pinot noir (Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, 2009).

Es así que la vid tiene una gran importancia económica y una presencia muy fuerte en el mundo y en particular en esta región de Francia, donde la vid, la uva y el *champagne* forman parte de la historia, la cultura y la economía de los habitantes.



Figura 2: Cepas cultivadas en el viñedo Champenois (Tomado de *Hebrard* 2006).

Como cualquier cultivo, la vid debe enfrentarse a plagas, enfermedades y/o condiciones abióticas adversas que pueden disminuir el rendimiento final de la uva. Sin embargo, existen fenómenos que se producen naturalmente en los viñedos sin que necesariamente el rendimiento de la planta se vea afectado. Este es el caso del corrimiento o *coulure*, que implica el aborto de las flores de la vid. En otras palabras, existe la caída de un cierto número de flores de la inflorescencia, lo cual es normal debido a que no todas las flores llegan a formar frutos.

Si bien se ha mencionado que este fenómeno se presenta normalmente en la naturaleza, existen condiciones estresantes (variaciones en las condiciones medioambientales, en los reguladores de crecimiento, etc.) que pueden aumentar dicha pérdida de flores. Evidentemente, esta elevación de la tasa de *coulure* de la vid puede afectar en gran manera la producción de uva y, por ende, el rendimiento final del cultivo, generando así fuertes estragos económicos para el viticultor.

Condiciones particularmente estresantes como el frío, las sequías o las precipitaciones importantes que se presenten durante el periodo de desarrollo de las estructuras reproductivas de la vid pueden afectar el éxito reproductivo en muchos

niveles (Lebon 2005). Las bajas temperaturas pueden hacer más lento el desarrollo de los órganos reproductores y aumentar la tasa de *coulure* (Ebadi *et al.* 1995b; Lebon 2005). Por consiguiente, se pone en evidencia el interés de estudiar el impacto de un estrés provocado por variaciones del medio ambiente, como las bajas temperaturas, que contribuyen a modificar el equilibrio fisiológico de la planta durante el desarrollo floral (Lebon 2005).

En lo que se refiere a la floración en la vid, el desarrollo de las estructuras reproductivas pasa por un momento crítico durante la meiosis ovular y polínica. Si durante esos estadios de desarrollo la planta sufre el impacto de algún estrés medioambiental, se podría producir el aborto de dichas estructuras, y por ende la *coulure* (Lebon 2005).

Asimismo, en los cultivares de vid resistentes a la *coulure*, el contenido de ciertos glúcidos es elevado en comparación con los cultivares sensibles a la *coulure* (Lebon *et al.* 2004). De allí que el aporte de glúcidos a la flor durante su desarrollo es un factor importante en el fenómeno de la *coulure* (Lebon *et al.* 2005a). Sin embargo, la información disponible acerca de la influencia precisa de dichos glúcidos en la iniciación de la inflorescencia o la formación floral es limitada (Lebon *et al.* 2008) así como el conocimiento de las variaciones que podrían sufrir debido a fluctuaciones en los factores medioambientales.

Por todo lo descrito anteriormente, se evidencia la estrecha relación causa-efecto que existe entre un estrés debido a las bajas temperaturas y el fenómeno de *coulure*. Los glúcidos entrarían en escena como posibles intermediarios en esta relación causa – efecto, puesto que existen diferencias en cuanto a las concentraciones de los glúcidos de reserva en las inflorescencias de cultivares de vid resistentes o no a la *coulure*. Por ende, es de gran interés poder dar pruebas de la existencia de un efecto directo de las bajas temperaturas sobre los glúcidos de reserva

de la inflorescencia de la vid, lo que podría explicar el aborto de las estructuras reproductivas y finalmente, la *coulure*.

Mientras la temperatura mínima media anual en la región Champagne – Ardenne, al noreste de Francia, se encuentra alrededor de los 5°C, las temperaturas mínimas durante los meses de abril y mayo se encuentran entre 3.7 y 7.7°C (Météo France). Sin embargo, las temperaturas bajas que pueden ser registradas solamente durante uno o dos días al mes, sobre todo durante las noches, serían suficientes para comprometer el desarrollo floral de la vid, especialmente si las plantas se encuentran próximas al estadio de la meiosis ovular y polínica, lo que induciría el fenómeno de *coulure*.

Debido a que dicho fenómeno puede llevar a provocar grandes pérdidas en referencia al cultivo de la uva en los viñedos franceses y en particular en esta región vitivinícola del noreste francés, es de gran importancia analizar cuál es el efecto de diferentes temperaturas frías durante toda una noche sobre los glúcidos de la inflorescencia de la vid y establecer una posible conexión entre la exposición a una noche fría y la *coulure*.

Este trabajo es parte de un proyecto más amplio titulado “*Étude des régulateurs de la floraison, notamment le métabolisme glucidique*” ejecutado en el *Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes (Université de Reims Champagne – Ardenne, Reims, France)* que busca analizar el rol de los reguladores de la floración de la vid, especialmente su efecto en el metabolismo de los glúcidos de la planta, involucrados en dicho proceso de floración.

A partir de este estudio se pretende obtener pruebas científicas acerca del efecto de las bajas temperaturas durante la floración de la vid. Estos datos, conjuntamente con los del gran proyecto sobre los reguladores de la floración, podrían ayudar a establecer posibles protocolos para inducir la *coulure* a nivel de laboratorio, lo que permitiría profundizar el estudio de la *coulure* y posteriormente aportaría a la

creación y establecimiento de criterios y/o dispositivos de evaluación, predicción y/o prevención para ayudar a los vitivinicultores a reducir y/o evitar las posibles pérdidas que una *coulure* causada por el frío podría provocar en la producción de la uva.

2. MARCO TEORICO

2.1 La Vid

La vid o *Vitis vinifera* L. es una planta que pertenece al orden de los *Vitales* y a la familia de las *Vitaceae*. Las *Vitaceae* son una familia de plantas leñosas perennes del grupo de las dicotiledóneas. Morfológicamente, se caracterizan por la presencia de zarcillos o de inflorescencias opuestas a las hojas (Lebon 2005). El patrón de formación y desarrollo de los órganos de las *Vitaceae* es diferente de aquellos descritos para las plantas herbáceas anuales o para las plantas leñosas policárpicas (Carmona *et al.* 2007; 2008), lo que resulta interesante para el estudio del desarrollo reproductor de estas plantas.

2.1.1 Morfología de la vid

Excepto en casos particulares (viñedos de pie franco o pre filoxéricos), la planta de vid cultivada en explotaciones comerciales está compuesta por dos individuos, uno constituye el sistema radical (*Vitis* spp. del grupo americano, en su mayoría), denominado patrón o portainjerto y, otro la parte aérea (*Vitis vinifera* L.), denominada púa o variedad (Fig. 3) (Cervera 2009; Lissarrague 2010). Esto es debido a que los pies de vides americanas han probado ser resistentes al ataque de la filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae*), insecto hemíptero parásito de la vid (Cervera 2009; Education à l'environnement 2010). Por ende, las raíces de la vid son parte del portainjerto americano, mientras que por encima, la variedad injertada es de origen francés (en el caso de los viñedos franceses) (Education à l'environnement 2010), la cual constituye el tronco, los brazos y los pámpanos que portarán las hojas, los racimos y las yemas (Fig. 3) (Lissarrague 2010).

2.1.1.1 Las raíces

Las raíces de la vid generadas a partir de esquejes se forman principalmente a nivel de los nudos y crecen en todas direcciones de los planos horizontal y vertical

(Fig. 3). Su longitud depende de la edad de la planta, la naturaleza del suelo y la labor de este último. Cuando se limita su crecimiento, las raíces pueden llegar a más de 10 metros de longitud, lo que confiere a la vid su tolerancia relativa a las sequías. En Europa las plantas de vid son usualmente cultivadas en suelos rocosos, sin embargo, esto no implica que las plantas crecen mejor en este tipo de superficies sino que en éstas no podría establecerse casi ningún otro cultivo. De la misma manera que el tallo, las raíces almacenan sustancias de reserva, principalmente bajo la forma de almidón que se movilizarán en la primavera. Por lo tanto, el desarrollo de una buena raíz es importante no sólo para el anclaje de la planta, la absorción de agua y minerales, sino también para una buena colocación de la fruta (Cliche 1969).

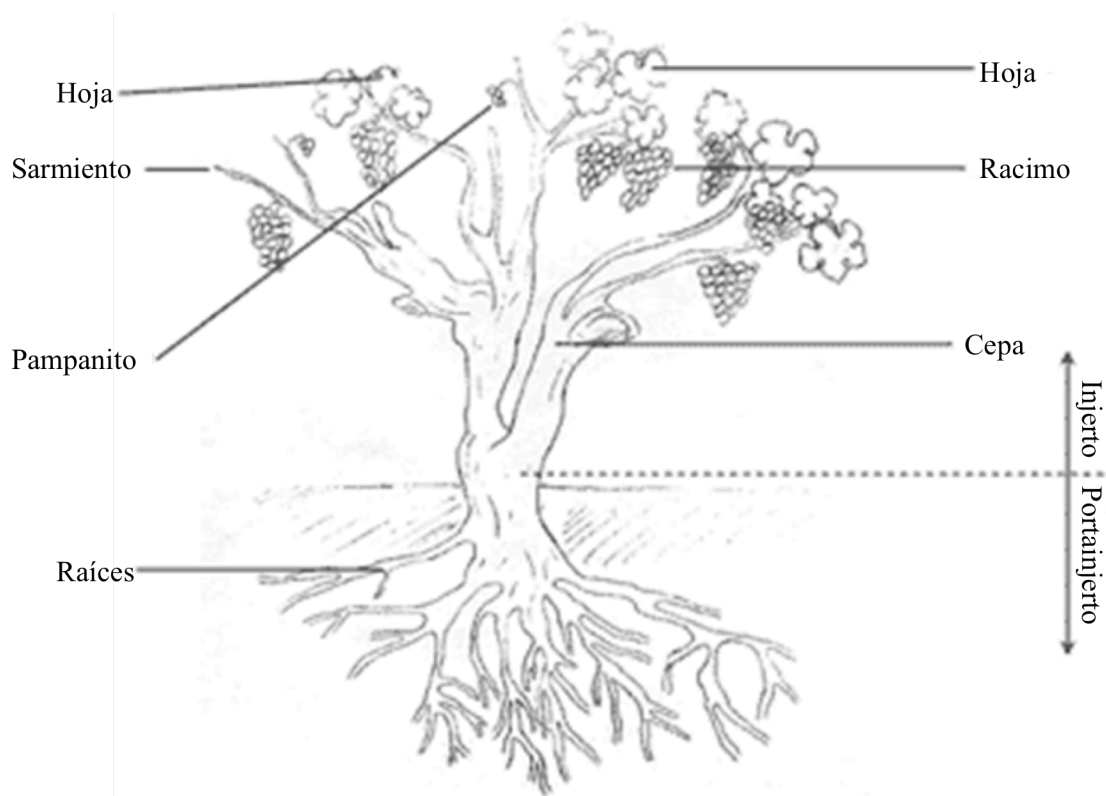


Figura 3: Partes de la vid (Modificado de *FranceAgriMer* 2010).

2.1.1.2 El tronco y las ramas

El tronco es de aspecto retorcido, sinuoso y agrietado, recubierto exteriormente por una corteza que se desprende en tiras longitudinales. La altura depende de la poda de formación, estando normalmente comprendida entre los 0.0 m (en un vaso manchego) y los 2.0 m (caso de un parral). El diámetro puede variar entre 0.10 y 0.30 m (Lissarrague 2010).

Los brazos o ramas son los encargados de conducir los nutrientes y repartir la vegetación y los frutos en el espacio. Al igual que el tronco, también están recubiertos de una corteza. Los brazos portan los tallos del año, denominados pámpanos cuando son herbáceos y sarmientos cuando están lignificados. El pámpano surge de un brote procedente del desarrollo de una yema normal. Este se desarrollará en un tallo constituido por una sucesión de nudos (zonas hinchadas) y entrenudos (espacio entre nudo y nudo). El pámpano porta las yemas, las hojas, los zarcillos y las inflorescencias (Fig. 4). (Lissarrague 2010).

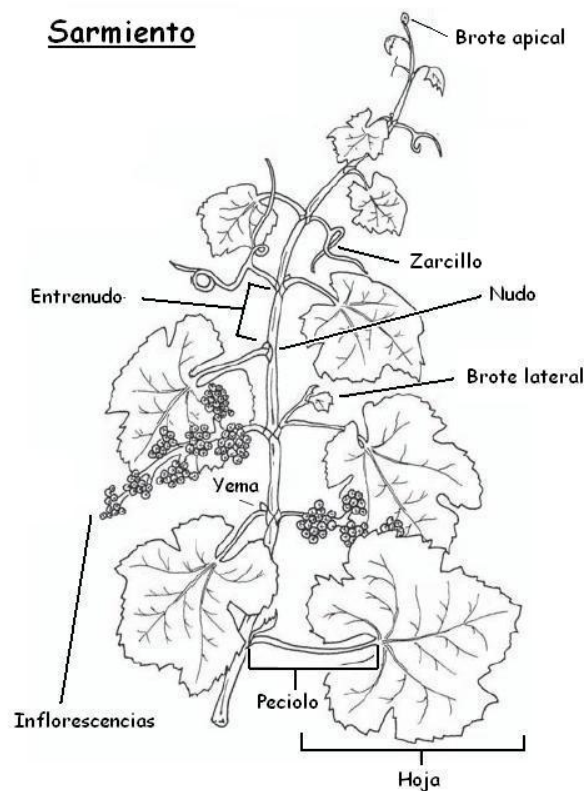


Figura 4: Partes de un sarmiento de vid (Tomado de *Buenavida* 2009).

2.1.1.3 Las hojas y los zarcillos

Las hojas están insertas en los nudos. En general son simples, alternas, dísticas con ángulo de 180° y divergencia normal de ½. Están compuestas por un pecíolo envainado o ensanchado en la base, y de un limbo pentalobulado y con borde dentado (Fig. 3 y 4) (Lissarrague 2010).

Los zarcillos son estructuras comparables a los tallos. Pueden ser bifurcados, trifurcados o polifurcados. Con función mecánica y con la particularidad de que sólo se lignifican y permanecen, los zarcillos que se enrollan (Fig. 4). Tienen una función de sujeción o trepadora (Lissarrague 2010). Los zarcillos y las inflorescencias tienen un origen semejante (Ver sección “*Ciclo reproductivo: la floración en la Vid*”) con lo que es frecuente encontrar estados intermedios.

Los zarcillos, en los pámpanos fértiles, se sitúan siempre por encima de los racimos. La distribución de zarcillos y/o inflorescencias más frecuente en el pámpano es la regular discontinua, que se caracteriza por lo siguiente: (i) hasta el tercer o cuarto nudo no hay órgano opositifolio; (ii) a continuación aparecen dos nudos consecutivos con racimo o zarcillo; (iii) el siguiente sin órgano opositifolio y así sucesivamente. La sucesión queda del siguiente modo: 0-0-0-1-1-0-1-1-0-..... (siendo 1, el racimo o zarcillo y 0, la ausencia de órganos opositifolios) (Lissarrague 2010).

2.1.1.4 La inflorescencia, la flor y el fruto

La inflorescencia de la vid se conoce con el nombre de racimo (Fig. 3 y 4) y es compuesto – racimo de cimas –. El racimo es un órgano opositifolio, es decir, se sitúa opuesto a la hoja. La vid cultivada lleva de uno a tres racimos por pámpano fértil. Lo más frecuente son dos racimos y rara vez salen cuatro (Lissarrague 2010).

El racimo está formado por un tallo principal llamado pedúnculo hasta la primera ramificación. La primera ramificación genera los denominados hombros o alas, éstas y el eje principal o raquis, se siguen ramificando varias veces, hasta llegar a las

últimas ramificaciones denominadas pedicelos que se expansionan en el extremo constituyendo el receptáculo floral que porta la flor (Fig. 5). Dos ramificaciones consecutivas forman un ángulo de 90°. Al conjunto de ramificaciones del racimo se le denomina raspón o escobajo (Lissarrague 2010).

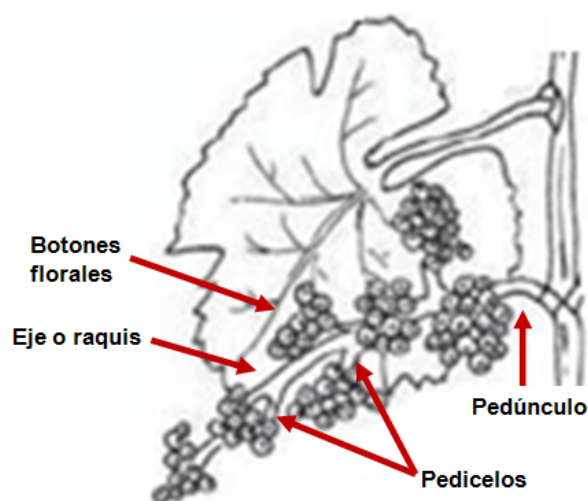


Figura 5: Partes de una inflorescencia de vid (Modificado de *Buenavida* 2009).

Los racimos presentan un número de flores variable según la fertilidad de las yemas que puede oscilar de 50 a 100 flores para los pequeños y de 1000 a 1500 en los grandes. La forma y tamaño final de los racimos es versátil según la variedad, clon y el estado de desarrollo (Lissarrague 2010).

La flor de la vid es de tipo 5: el cáliz rudimentario está formado por 5 sépalos; la corola verde, alternisépala y dialipétala está formada por 5 pétalos; el androceo de dehiscencia introrsa está formado por 5 estambres y finalmente el gineceo está formado por 2 carpelos fusionados (Fig. 6) (Clément 2010).

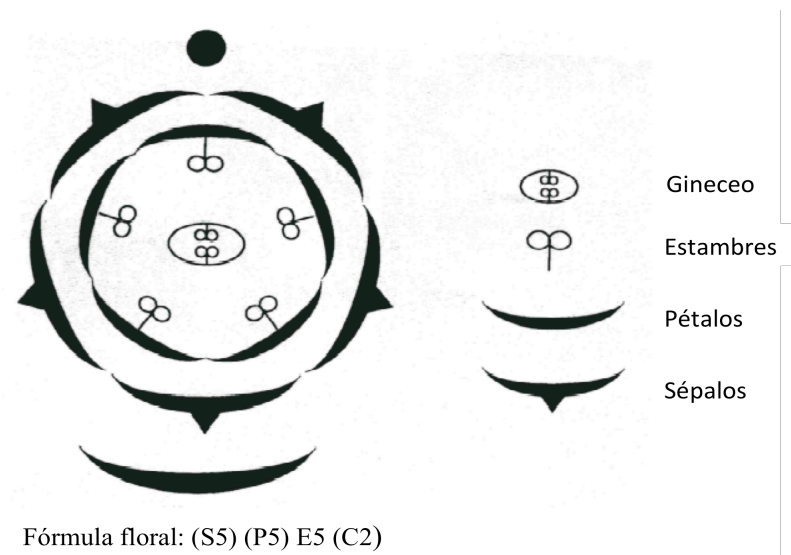


Figura 6: Diagrama floral de la vid (Modificado de *Gerrath* 1993).

Resumiendo, el fruto es una baya de forma y tamaño variables, más o menos esférica u ovalada, y por término medio de 12 a 18 mm de diámetro. Se pueden distinguir tres partes del fruto: (i) el hollejo, la parte más externa de la uva, que le sirve de protección; (ii) la pulpa, que representa la mayor parte del fruto; y (iii) la pepita que son las semillas que portan el albumen y el embrión (Lissarrague 2010).

2.1.2 Ciclo de Desarrollo

2.1.2.1 Generalidades

La vid es una planta perenne cuyo ciclo de desarrollo sigue un patrón que se repite cada año en función de las estaciones, pasando sucesivamente por la floración, fructificación, latencia y regeneración.

En las regiones templadas la vid está sometida a un ritmo o ciclo anual constituido por un periodo de vida activa, en el que se desarrollan los aparatos vegetativos y reproductores y se forman las yemas, y un periodo de reposo que coincide con la estación invernal. Durante el periodo de actividad anual se puede distinguir un ciclo vegetativo y un ciclo reproductor, ambos simultáneos en el tiempo (Lissarrague y Baeza 2008).

En el hemisferio norte, entre los meses de noviembre y febrero, la vid entra en un periodo de reposo invernal o de latencia en el cual la actividad de la planta se encuentra reducida y la savia no circula (Fig. 7a). En primavera, entre los meses de marzo y abril, los brotes retoman su crecimiento (Fig. 7b). Luego, entre mayo y junio se inicia la floración donde las yemas florales aparecen (Fig. 7c). En julio el crecimiento continua y luego de la antesis y la polinización de las flores, comienza el cuajado o desarrollo del fruto. En agosto, en medio del proceso de maduración de las uvas, éstas cambian su color y maduran; a este periodo de coloración de la uva se le conoce como envero. Finalmente, en otoño, entre septiembre y octubre, las uvas maduras se recolectan (la vendimia) y un nuevo ciclo comienza (Fig. 7d).



Figura 7: Ciclo de desarrollo de la vid según las estaciones: (a) en invierno, (b) en primavera, (c) en verano durante el estadio de « inflorescencias visibles con botones florales aglomerados » y (d) uvas maduras (Tomado de *FranceAgriMer* 2010).

Debido a la complejidad de la formación de las inflorescencias y de las flores, se necesita una clasificación guía que ayude a establecer el estadio de desarrollo en el cual se encuentran las plantas de este estudio. La escala BBCH (abreviación de Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and CHemical industry) establecida por Meier en el 2001 brinda una clasificación universal de los estados fenológicos de las

mono- y dicotiledóneas cultivadas, y que engloba las clasificaciones anteriormente propuestas por Bagiollini (1952) y Eichhorn & Lorenz (1977).

Con respecto a la vid, el primer estadio (BBCH 00) corresponde a la yema de invierno o en latencia, mientras que el último estadio (BBCH 97) corresponde al fin de la caída de las hojas en otoño. Entre estos dos estadios, la vid pasa por (i) el estadio BBCH 13 donde las hojas comienzan a brotar, (ii) el estadio BBCH 53 donde las inflorescencias son claramente visibles, (iii) el estadio BBCH 55 donde las inflorescencias están separándose pero los botones florales permanecen y, (iv) el estadio BBCH 57 donde los botones florales se separan. Además, ciertos momentos importantes durante el desarrollo de la vid como la floración, el envero y la madurez de las bayas corresponden respectivamente a los estadios BBCH 65, BBCH 81 y BBCH 89 (Meier 2001) (Fig. 8).



Figura 8: Estadios fenológicos de la vid. Cada etapa está definida por *dos cifras* en el orden establecido y según la escala BBCH. [Además se especifica la codificación respectiva a cada etapa según la escala de Baggiolini -mediante una letra-, y a la de Eichhorn and Lorenz -mediante dos cifras-.] (Modificado de Institut Français de la Vigne et du Vin).

2.1.2.2 Ciclo vegetativo de la Vid

Durante el primer año del ciclo bianual de la vid, la planta debe iniciar su desarrollo vegetativo y adquirir las condiciones necesarias para superar el periodo de frío invernal. Esto asegurará el desarrollo reproductivo y la consecuente producción durante el segundo año. Este ciclo vegetativo comprende dos procesos importantes: el desarrollo de los órganos vegetativos y el agostamiento (Lissarrague y Baeza 2008).

Todo inicia con el estadio BBCH 00 o de letargo, donde se encuentra la presencia de las yemas de invierno de la vid. Justo antes de pasar al estadio BBCH 01 en el cual el “desborre” o hinchado de las yemas comienza, antes que haya alguna evidencia de que la yema de invierno ha iniciado su actividad vegetativa, se pueden observar los llamados “lloros” a nivel de las heridas de poda (Fig. 9) (Lissarrague y Baeza 2008).



Figura 9 : Los “lloros” de la vid (Tomado de <http://vinsbenjaminportier.blogspot.com/>).

Los lloros son emanaciones que se producen cuando la temperatura del suelo es suficientemente alta para que el sistema radical inicie su actividad. Las raíces comienzan a absorber agua y arrastran a su paso las sustancias que encuentran en su recorrido. Al no haber ningún punto de demanda en la parte aérea, esta disolución acuosa es vertida al exterior por las únicas salidas presentes en ese momento, las heridas de poda. La composición de estos lloros es básicamente agua con sustancias orgánicas y minerales disueltos (Lissarrague y Baeza 2008).

El desborre es la primera manifestación visible de que la planta ha retomado su desarrollo. Las yemas empiezan a hincharse debido al aumento del volumen de sus células y a la proliferación meristemática. Los botones se hinchan, las escamas se abren y la borra se hace visible (estado BBCH 03, Fig. 8) (Meier 2001; Lissarrague y Baeza 2008). El cono de la yema da lugar al pámpano, las hojas, las inflorescencias y los zarcillos primordiales a sus órganos correspondientes. Según la variedad, el desborre se produce cuando las temperaturas medias diarias están comprendidas entre los 9°C y 13°C (Lissarrague y Baeza 2008). A medida que pasa el tiempo el pámpano crecerá tanto en espesor como en longitud hasta que llega el momento del agostamiento.

El proceso por el cual el pámpano (de naturaleza herbácea) se transforma en sarmiento (de naturaleza lignificada) se conoce como agostamiento. Exteriormente se observa un cambio de color del pámpano verde, a marrón, denominándose, a partir de este momento, sarmiento. Comienza en agosto, coincidiendo con la parada de crecimiento, y termina cuantitativamente en septiembre, pero siguen produciéndose cambios cualitativos, en el interior de la planta, hasta la caída de las hojas. Lo que exteriormente no haya agostado en septiembre quedará sin agostar y se perderá con los primeros fríos del otoño (Lissarrague y Baeza 2008).

El agostamiento coincide con la parada vegetativa de verano, la entrada en latencia de las yemas normales, la madurez fisiológica de las semillas, el envero y la

maduración de las bayas (Lissarrague y Baeza 2008). Este proceso es necesario para garantizar la perennidad de las yemas a corto plazo y la supervivencia del individuo a largo plazo. La planta agostada resistirá las bajas temperaturas invernales. Las yemas pueden llegar a soportar hasta -15°C . La acumulación de sustancias de reserva garantiza una buena brotación y el desarrollo de los pámpanos en las primeras fases del segundo año (Lissarrague y Baeza 2008).

2.1.2.3 Ciclo reproductor: la floración en la Vid

La floración de la vid requiere de dos estaciones consecutivas de crecimiento (Fig. 10) separadas por un periodo de latencia entre el otoño y la primavera (Carmona *et al.* 2007; 2008; Lebon *et al.* 2008; Vasconcelos *et al.* 2009).

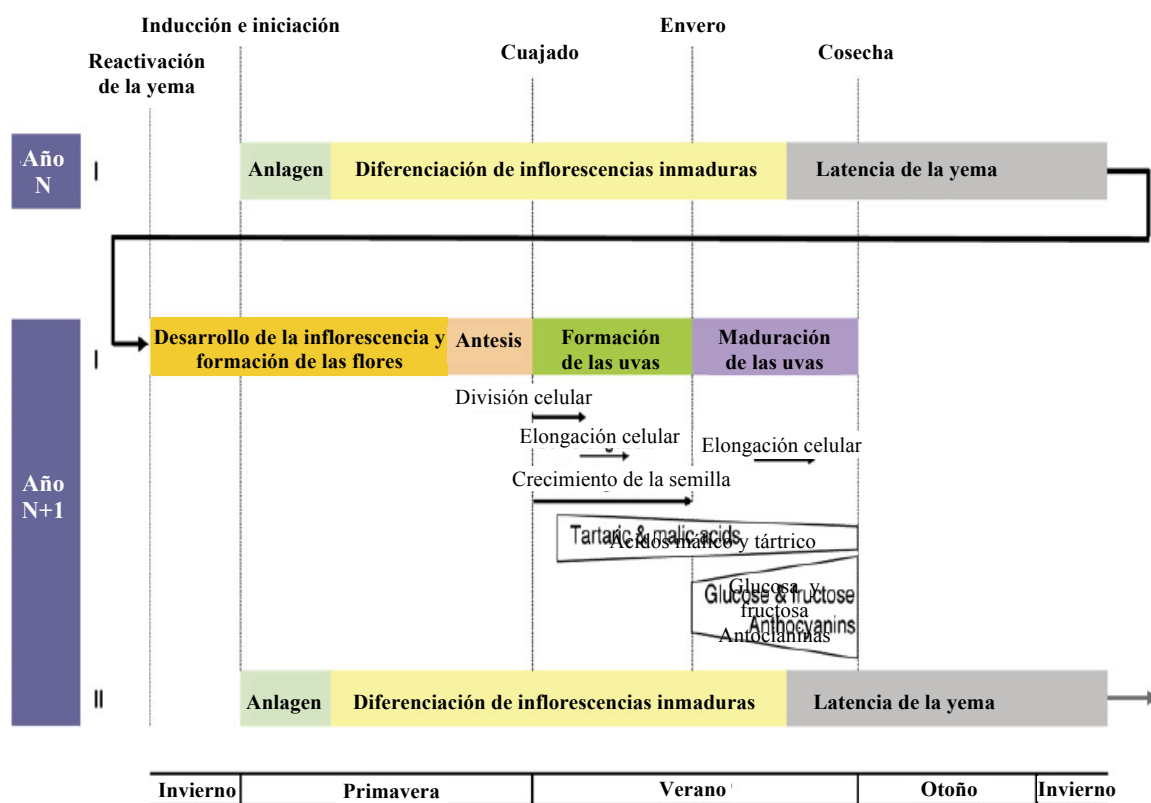


Figura 10: Ciclo del desarrollo reproductivo de la vid a lo largo de dos años consecutivos. Se muestran los estadios de floración y dos fases del desarrollo de las bayas. El inicio y el final de los estadios fenológicos y de la cosecha pueden cambiar según la región, el clima, el cultivar y las prácticas culturales. Los estadios antes y después del envero son definidos como los estadios de formación y maduración de las uvas, respectivamente. (Modificado de Carmona *et al.* 2008).

Los meristemos axilares de las hojas se desarrollan en yemas, es decir, en estructuras protegidas por brácteas. Éstas se encuentran insertadas en el nudo, por encima de la axila de inserción del peciolo. El meristemo desarrolla dos yemas por nudo: la yema pronta o anticipada y la yema normal o latente (Lisarrague y Baeza 2008).

La yema anticipada se conoce también como “yema lateral de verano” y es la yema más pequeña situada en la axila de la hoja. Esta yema puede desarrollarse el mismo año de su formación (año N), generando los nietos, es decir, pámpanos de menor desarrollo y fertilidad y de agostamiento más incompleto que el pámpano principal debido a su ciclo de desarrollo más reducido (Lisarrague y Baeza 2008).

La yema normal, yema latente o “yema de invierno” está compuesta por un cono primario o principal que generará los nuevos brotes el año siguiente a su formación (año N+1), así como por 1 o 2 conos secundarios, que entran en latencia durante el invierno (Carmona *et al.* 2007; 2008; Srinivasan & Mullins 1980).

La inducción floral ocurre en esta yema latente durante el verano del año N. Sin embargo, la iniciación floral, la reorganización del meristemo floral y el desarrollo de los esbozos florales suceden solamente durante la primavera del año N+1.

Efectivamente, tres etapas son esenciales para la formación de las inflorescencias y de las flores: la formación del *Anlagen*, la diferenciación del *Anlagen* para formar los primordios de las inflorescencias, y la diferenciación floral (Srinivasan & Mullins 1980; Archer & Swanepoel 1987; Lebon *et al.* 2008) (Fig. 11).

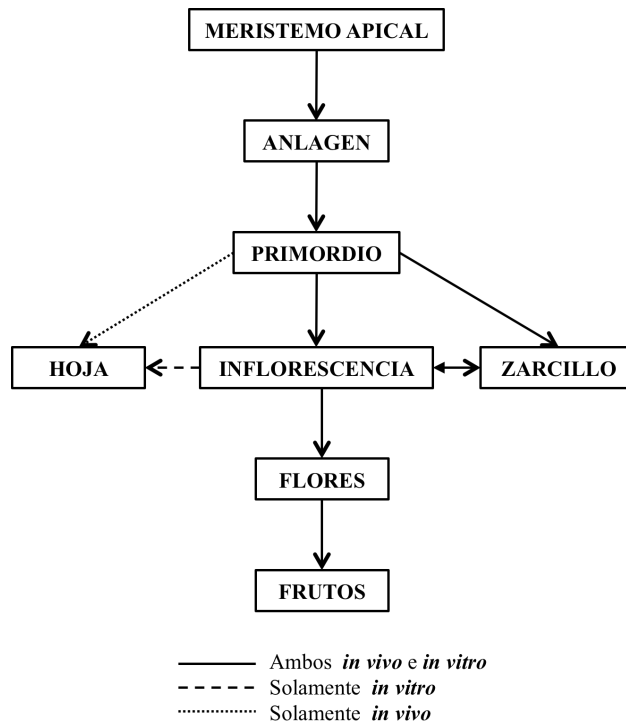


Figura 11: Vías de desarrollo del *Anlagen* (Modificado de Srinivasan & Mullins 1981).

Durante el desarrollo de las yemas en la vid, el meristemo apical produce los primordios foliares así como una estructura meristemática conocida bajo el nombre de *Anlagen* (denominación alemana para los primordios indeterminados). Estos primordios indeterminados se diferenciarán en estructuras extra-axilares cuya naturaleza depende del estado de desarrollo de la planta y del medio ambiente en el cual los primordios se han formado (Vasconcelos *et al.* 2009): los primordios de las yemas latentes generaran los primordios de las inflorescencias, mientras que aquellos que crecen muy rápido generaran los zarcillos característicos de la vid.

Asimismo, los factores externos como la luz y la temperatura y los factores internos como los reguladores de crecimiento y los azúcares de reserva determinan si los primordios darán origen a las inflorescencias o a los zarcillos (Srinivasan & Mullins 1980; Archer & Swanepoel 1987; Lebon *et al.* 2008). Posteriormente el meristemo de la inflorescencia comienza a proliferar para producir meristemas adicionales con una

filotaxia en espiral, formando una estructura inmadura en forma de racimo (Carmona *et al.* 2008).

Al final del verano la yema encierra un brote apretado junto con un meristemo de la inflorescencia y los primordios del zarcillo y de la hoja. Esas yemas están protegidas de la desecación y las heladas por brácteas, estípulas y pelos epidérmicos, entrando en latencia durante el otoño. En la primavera siguiente, la del año N+1, cuando las condiciones medioambientales lo permiten, el crecimiento de la yema se retoma y el meristemo continua la producción de los primordios foliares y de los zarcillos (Carmona *et al.* 2007; 2008).

Una vez que las yemas latentes se reactivan, las inflorescencias inmaduras retoman su diferenciación junto con la formación de los órganos florales (Lebon 2005). Cada meristemo de inflorescencia se divide en grupos de tres o cuatro meristemas para crear un dicasio, razón por la cual las inflorescencias de la vid tienen la forma de racimos constituidos por varias ramas, obteniendo el carácter cónico característico del racimo de uva (Lebon *et al.* 2008). Las flores terminales se desarrollan en primer lugar, luego las flores laterales y finalmente las flores mas basales (Carmona *et al.* 2008).

En abril, las inflorescencias se vuelven visibles, el cáliz y la corola están ya formados y los estambres emergen. En mayo, algunas semanas antes de la floración, las inflorescencias se separan pero los botones florales persisten aglomerados, el cáliz y la corola están bien desarrollados y los estambres inician la diferenciación de la antera y el filamento mientras que la fusión de los carpelos ocurre. En junio, alrededor de la quincena del mes, los botones florales aun no se abren pero su desarrollo ya ha terminado puesto que los óvulos están maduros y los estambres diferenciados (Clément 2010).

Durante el desarrollo floral los pétalos cubren los sépalos, para luego degenerar y fusionarse en su parte apical formando la “capucha” que protege los

órganos reproductores (Srinivasan & Mullins 1980; Lebon *et al.* 2008). La capucha se cae en el momento de la antesis debido al crecimiento de los estambres (Fig. 12).

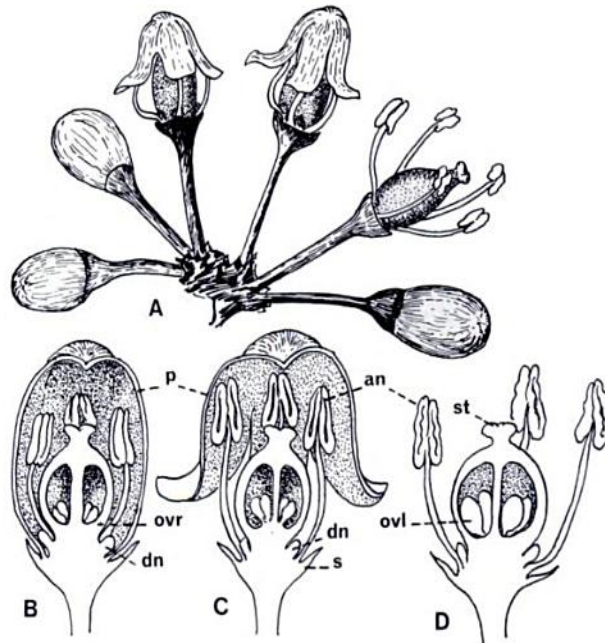


Figura 12: Inflorescencia de la vid. (A) Varios estadios de la caída de la capucha que protege los estambres y el ovario. (B), (C), (D) Secciones sagitales de la flor, en diversos estadios de su evolución. an = anteras; dn = disco de néctar; ovr = ovario; ovl = óvulos; p = pétalos fusionados formando la capucha; s = sépalos; st = estigma. (Según Peasson et Louveaux 1984).

En este momento se considera que la fecundación ya ha tomado lugar puesto que la gran mayoría de las variedades poseen flores hermafroditas donde la autopolinización es dominante; sin embargo, la fecundación cruzada puede suceder y es utilizada por los seleccionadores en el mejoramiento del desarrollo de las semillas en la baya (Huglin 1986; Vasconcelos *et al.* 2009).

Es importante mencionar que el desarrollo del órgano reproductor masculino y/o femenino puede ser afectado por fluctuaciones medioambientales tales como la temperatura y la luz, en el momento del desborre de las yemas (Carbonneau *et al.* 2007; Lebon *et al.* 2008). La germinación del polen depende de la temperatura y la nutrición de la planta. Las temperaturas del aire inferiores a 15°C son desfavorables al crecimiento del tubo polínico (Carbonneau *et al.* 2007).

Asimismo, la cinética de desarrollo depende de la variabilidad de las cepas. En realidad, en el Pinot noir la meiosis masculina da lugar entre los estadios BBCH 53 y BBCH 55, y la meiosis femenina, entre los estadios BBCH 55 y BBCH 57 (específicamente entre los estadios BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días), mientras que en el cultivar Gewurztraminer, la meiosis masculina da lugar entre los estadios BBCH 55 y BBCH 55 + 2 días y la meiosis femenina, entre los estadios BBCH 55 + 8 días y BBCH 57 (Lebon *et al.* 2008) (Fig. 13).

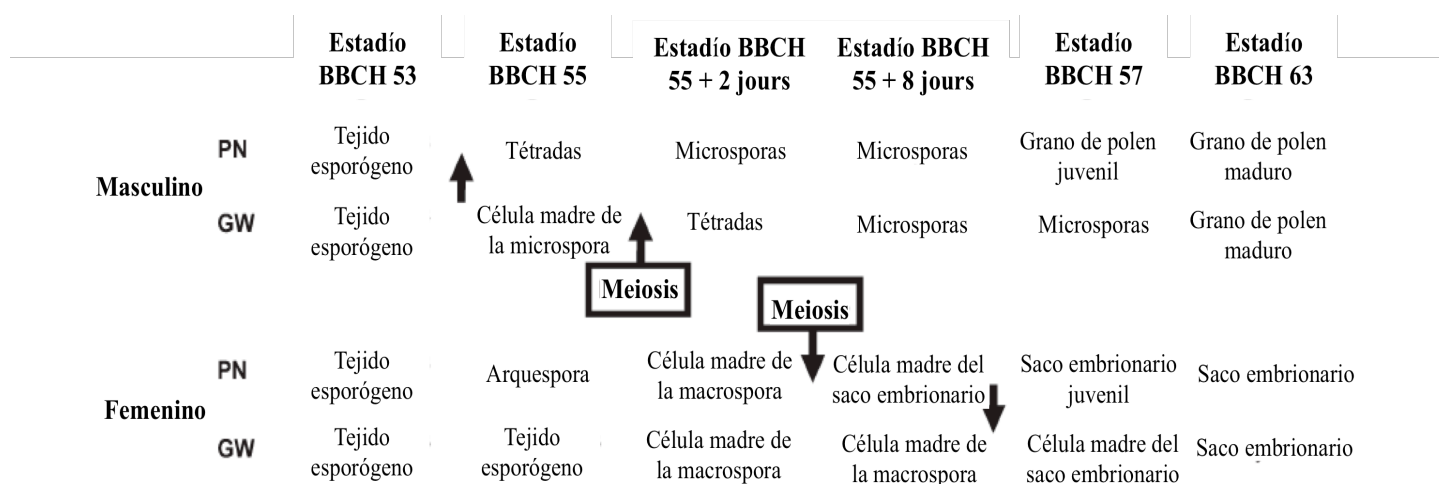


Figura 13: Determinación del estadio de desarrollo en los cultivares Pinot noir (PN) y Gerwurztraminer (GW). Los momentos de la meiosis masculina y femenina se señalan según la fenología. Los estadios intermedios se agregan entre los estadios BBCH 55 y 57 (55 + 2 días y 55 + 8 días) para definir el momento de la meiosis con la mayor precisión posible (Modificado de Lebon *et al.* 2008).

La meiosis es una etapa muy importante en el desarrollo de toda planta porque determina el éxito de la reproducción sexual, la producción de frutos y semillas y por ende la perennidad de la especie en el tiempo. Por esta razón los granos de polen y los óvulos son muy sensibles a los diferentes tipos de estrés que podrían presentarse a lo largo de su desarrollo, en particular durante la meiosis, lo que causaría una reducción en el aporte de glúcidos a las flores, provocando finalmente perturbaciones en la meiosis y el corrimiento, caída o “*coulure*” de las flores (Lebon *et al.* 2004, 2008).

2.1.2.4 Factores que afectan la floración

Generalmente, los estudios acerca de la floración de la vid, especialmente acerca del desarrollo de las estructuras reproductivas se han realizado en viñedos en condiciones climáticas estándar (Langellier 2002; Langellier *et al.* 2003; Lebon 2005). Los estímulos medioambientales que inducen la floración en la vid son la exposición a temperaturas elevadas así como una intensidad luminosa elevada (Carmona *et al.* 2007; 2008; Vasconcelos *et al.* 2009). De hecho, una temperatura caliente junto con una iluminación suficiente de la yema así como la ausencia de estrés favorecen la iniciación de la floración (Vasconcelos *et al.* 2009). Además, las condiciones calientes y secas son importantes para la dehiscencia y la germinación del grano de polen.

Las etapas críticas para la floración son la inducción, la iniciación y la diferenciación precoz durante el año N, así como la diferenciación y el inicio del crecimiento de la yema durante el año N+1. Las variaciones a lo largo de las diferentes estaciones contribuyen a la aparición de grandes fluctuaciones en la producción y la calidad del viñedo, en particular en las regiones templadas (Vasconcelos *et al.* 2009). Los factores medioambientales influyen sobre la fisiología de la planta, especialmente sobre las hormonas endógenas y la fotosíntesis (Vasconcelos *et al.* 2009).

El agua ejerce su influencia sobre la fertilidad de las yemas, de una manera directa por la calidad del agua disponible para la biosíntesis de la planta e indirectamente por su rol en la fotosíntesis, la absorción de nutrientes y el mantenimiento del microclima alrededor de la yema (Vasconcelos *et al.* 2009). Es por ello que un estrés hídrico importante cambiaría el balance hormonal de la planta al igual que afectaría la inducción floral.

El aporte de nitrógeno es necesario para la formación de los primordios florales y la diferenciación floral. Del mismo modo, una cantidad óptima de fosfato promueve la fertilidad de las yemas, mientras que una deficiencia en este elemento altera el desarrollo de los primordios de inflorescencias.

En la vid, los efectos de la temperatura están relacionados al genotipo (Lebon 2005). Sin embargo, la temperatura óptima para el ciclo vegetativo es de 25°C y, según la cepa y el clima del verano, ésta puede elevarse hasta 30°C (Carbonneau *et al.* 2007).

Del mismo modo, las temperaturas superiores a 20°C son necesarias para promover una iniciación floral óptima durante la primera estación, pero existen variaciones entre los cultivares con diferentes orígenes geográficos. El inicio y la velocidad del desborre de las yemas (Vasconcelos *et al.* 2009), el desarrollo de la flor, la floración, la polinización y la receptividad del estigma (Carbonneau *et al.* 2007) dependen esencialmente de la temperatura.

2.2 Efectos del estrés causado por el frío en la vid

2.2.1 Generalidades

La exposición a bajas temperaturas es uno de los factores más importantes que afectan la distribución de las plantas en el mundo, especialmente en el caso de plantas que crecen a elevadas latitudes o altitudes, debido a que estas plantas deben tener mecanismos que permitan no sólo soportar las bajas temperaturas sino que les ayuden a prolongar su periodo de crecimiento más allá de un verano de corta duración (Stitt and Hurray, 2002).

Las bajas temperaturas reducen la actividad enzimática al interior de las células y modifican la conformación de lípidos y de otras moléculas, lo cual afecta evidentemente la mayoría de los procesos biológicos (Stitt & Hurray, 2002). Además, la formación de hielo a nivel intracelular es destructiva para las células (Allen & Ort, 2001; Stitt & Hurray, 2002).

La determinación de la resistencia de las variedades a las heladas de invierno es compleja puesto que el grado de resistencia de una misma planta varía considerablemente según su estado fisiológico. Para una misma cepa, los primeros órganos afectados son las yemas principales, luego, en orden de sensibilidad

decreciente, las yemas secundarias, el cambium de los sarmientos, el cambium de las ramas y el tronco y finalmente las raíces (Huglin, 1986).

Es de interés mencionar la sensibilidad de los óvulos a las bajas temperaturas (menores a 10°C) durante la macrosporogénesis, es decir entre tres y cuatro semanas antes de la floración (Carbonneau *et al.* 2007), lo que afectaría el desarrollo normal del óvulo. En efecto, Ebadi (1995b) mostró que la aplicación de temperaturas frías (12°C día/9°C noche) comenzando 2 días antes de la antesis y durante una semana provocó una reducción del 30% en el tamaño de las flores en los cultivares Chardonnay y Shiraz.

2.2.2 Efectos en la fotosíntesis y el metabolismo del carbono

La fotosíntesis es uno de los primeros procesos que se ven afectados por las bajas temperaturas en plantas sensibles al frío (Flexas *et al.* 1999). Según Allen and Ort, 2001 y Bertamini *et al.* 2005, un estrés causado por el frío limitaría la fotosíntesis a través de la oclusión de los estomas, la inhibición de la cadena de transporte de electrones en los tilacoides así como la fotofosforilación, la inhibición de enzimas claves en la biosíntesis de la sacarosa y el almidón, la inactivación de la RuBisCO (Ribulosa 1,5-Bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa) y del flujo en el floema (Fig. 14) (Allen and Ort, 2001).

De la misma manera, el metabolismo del carbono muestra una sensibilidad instantánea a las bajas temperaturas en comparación con otros componentes de la fotosíntesis (Allen and Ort, 2001). Sin embargo, la información disponible acerca de la influencia precisa de los glúcidos en la iniciación de la inflorescencia o la formación floral es limitada (Lebon *et al.* 2008) así como el conocimiento de las variaciones que podrían sufrir debido a fluctuaciones en los factores medioambientales.

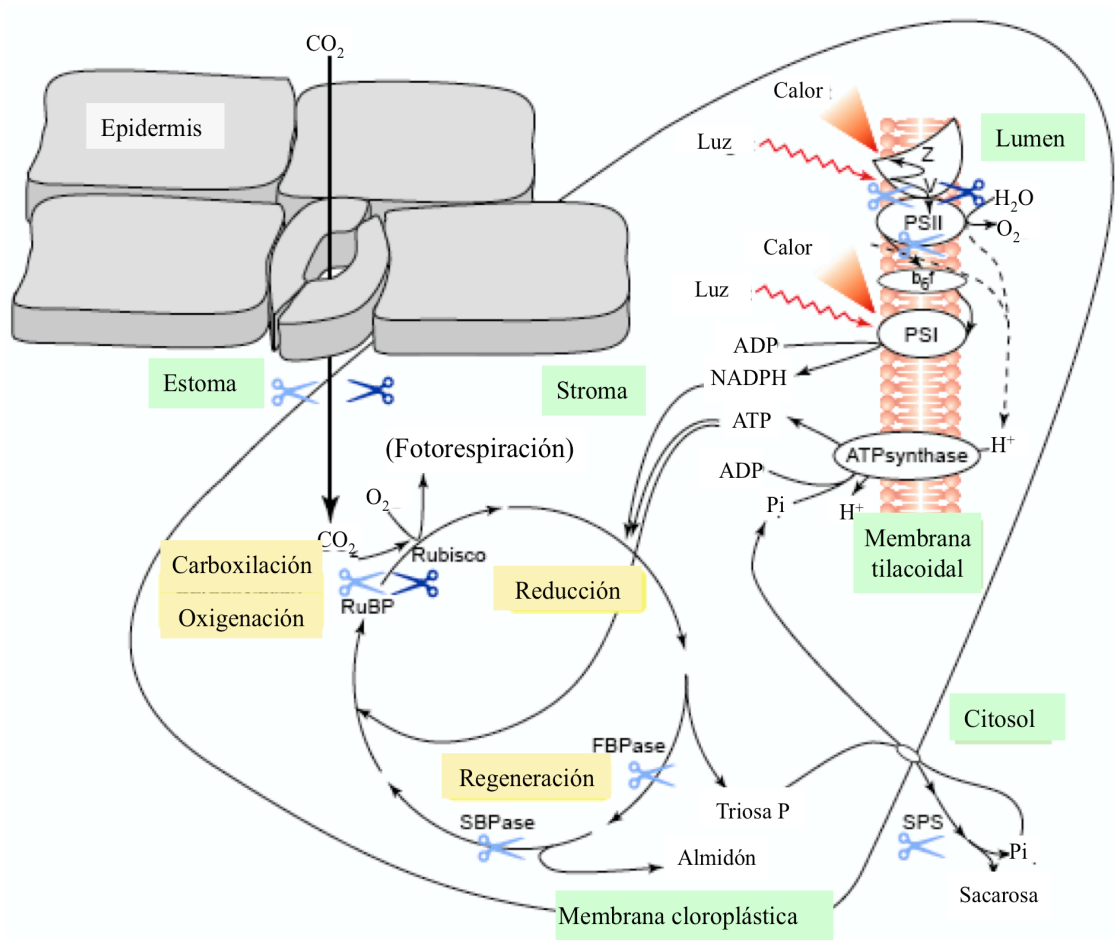


Figura 14: Efectos de un corto estrés debido al frío o la oscuridad (✂) o a la luz (✂). El proceso de fotorespiración (a nivel de la membrana tilacoidal), el ciclo de Calvin, la utilización de glúcidos en el citosol y el suministro de CO_2 por los estomas son afectados. V = violaxantina; Z = zeaxantina et anteraxantina; FBPase = fructosa 1,6 bisfosfatasa; SBPase = sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa (Modificado de Allen & Ort 2001).

2.2.3 La "Coulure"

El rendimiento por hectárea de un viñedo está determinado por el criterio de poda y el ajuste de la carga implementado (Callejas *et al.* 2004). Sin embargo, el porcentaje de cuajado (desarrollo del fruto) es un dato muy variable de un cultivar a otro, y depende del tamaño del racimo. Los cultivares de racimo grande, con unas 1500 flores por racimo, puede tener un cuajado normal del 15 al 20% mientras que en cultivares de racimos pequeños, con unas 100 a 200 flores por racimo o menos, el

porcentaje de cuajado normal ronda el 40 al 60%. Cuando el cuajado es anormalmente bajo se habla de corrimiento (Lissarrague y Baeza 2008).

Callejas *et al.* (2004) definen el corrimiento como “*el accidente que padece el racimo de la vid en la época de la florescencia cuando se imposibilita o entorpece la fecundación y resultan los racimos desmembrados, con pocas bayas desarrolladas o definitivamente sin frutos*”.

En francés se utiliza el término « *coulure* » para denominar este fenómeno de corrimiento que se produce naturalmente en los viñedos entre el momento de la floración y la fertilización (Lebon *et al.* 2008). Este fenómeno se caracteriza por la caída de un cierto número de flores, lo que hasta cierto punto es normal puesto que no todas las flores de la inflorescencia llegaran a formar frutos (Carbonneau *et al.* 2007). Esto depende de la variedad y del número inicial de flores presentes en la inflorescencia (Lebon *et al.* 2008). La pérdida de flores se debe a la existencia de una zona de abscisión, sea inducida o preexistente, situada en la base del pedicelo de la flor (Carbonneau *et al.* 2007).

Sin embargo, la exposición a un estrés aumenta la tasa de *coulure* natural que afecta directamente el rendimiento de los viñedos (Lebon *et al.* 2008). Las causas de este fenómeno pueden ser diversas. Entre ellas tenemos: (i) el factor varietal, puesto que hay variedades como la Garnacha y el Merlot que tienden al corrimiento inducido por un desarrollo vegetativo muy rápido, sacrificando el desarrollo floral; (ii) el factor genético, debido a la mala conformación de estambres o a la tendencia a favorecer el desarrollo vegetativo frente al reproductor; (iii) el factor ambiental, como el exceso de lluvias o las temperaturas inferiores a 15°C que son negativas para una buena polinización y fecundación de las flores; (iv) el vigor de la planta, que favorece el desarrollo vegetativo en lugar del reproductor; (v) las practicas de cultivo, donde el exceso en el aporte de nitrógeno, el exceso de agua de riego, o los daños mecánicos al racimo aumentan dicha tasa de corrimiento (Lissarrague y Baeza 2008).

Dentro de los factores medioambientales, la temperatura, las sequías, la humedad excesiva o la luz pueden provocar la *coulure*. Además, se ha mostrado que las variaciones en la concentración de ciertos reguladores de crecimiento como las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el etileno y las poliaminas tienen un impacto en el cuajado (Lebon *et al.* 2008).

Independientemente de su origen, el primer signo de *coulure* es la presencia de anomalías en el desarrollo del ovario durante la meiosis. Antes de ésta, los óvulos pueden sufrir una involución debido a un desarrollo anormal de la nucela, los tegumentos internos y externos, mientras que luego de la meiosis, el saco embrionario puede interrumpir su desarrollo o degenerar (Lebon 2005). La necrosis a nivel floral sería inducida por alteraciones en el metabolismo del carbono provocados por perturbaciones fisiológicas debido a factores medioambientales u hormonales (Lebon *et al.* 2004; 2008).

Es importante mencionar que en los cultivares de vid resistentes a la *coulure*, el contenido de ciertos glúcidos es elevado en comparación con los cultivares sensibles a la *coulure*. De hecho, en el caso del Pinot noir, un cultivar resistente a la *coulure*, entre los estadios BBCH 55 y BBCH 57, las concentraciones de glucosa y fructosa en la inflorescencia son más elevadas que aquellas de sacarosa y de almidón, en comparación al cultivar Gerwurztraminer (Lebon *et al.* 2004). Sin embargo, la concentración del almidón es importante a nivel de los óvulos de Pinot noir, sobre todo durante el estadio BBCH 55 + 3 días (Lebon *et al.* 2005). De allí que el aporte de los glúcidos a la flor durante su desarrollo es un factor importante en el fenómeno de la *coulure* (Lebon *et al.* 2005).

2.3 Los Glúcidos

Los glúcidos son un importante factor de crecimiento porque constituyen tanto la fuente energética como el material de biosíntesis de la planta. Estos glúcidos tienen dos orígenes: la fotosíntesis y las reservas de almidón (Champagnol 1984).

2.3.1 El metabolismo del carbono

La fotosíntesis agrupa todas las reacciones bioquímicas que permiten a los organismos clorofilianos transformar la energía luminosa que captan del sol en energía química para la síntesis de glúcidos (Lebon 2005). Al final de las dos fases de la fotosíntesis, las fases luminosa y oscura, se obtiene el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) (Huglin 1986; Lebon 2005), el cual es utilizado para la síntesis de almidón en el cloroplasto o exportado hacia el citoplasma, donde podrá ser utilizado en la síntesis de sacarosa. Esta sacarosa producida tiene dos posibles destinos: es acumulada en la vacuola de la célula fuente o es transportada hacia las células sumidero para servir de fuente de energía o para la síntesis de almidón (Lebon 2005).

La fotosíntesis se encuentra activa en las células del mesófilo de la hoja bien desarrollada y los fotoasimilados son cargados al floema para su transporte, principalmente bajo la forma de sacarosa, hacia los meristemos y los órganos en desarrollo tales como las hojas jóvenes, las raíces, las flores, las bayas y las semillas, según el flujo de asimilados desde los órganos fuentes hacia los órganos sumideros (Fig. 15).

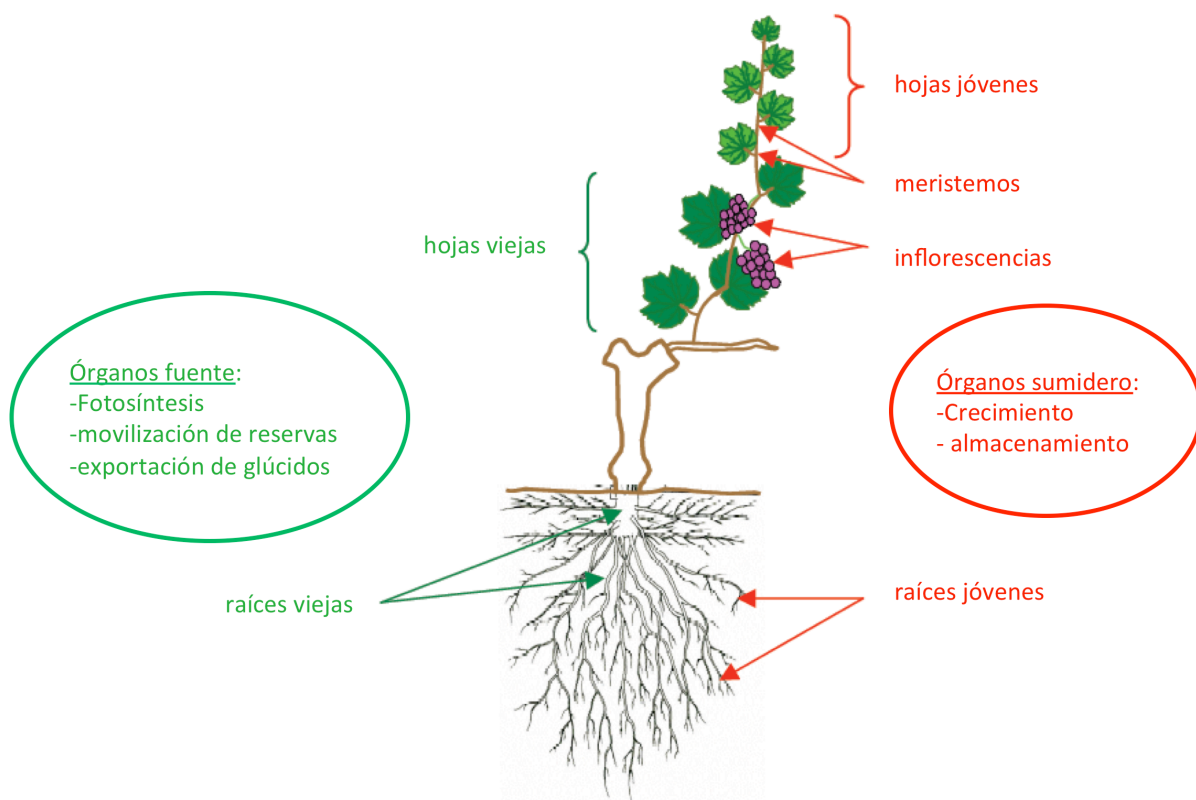


Figura 15: Localización y funciones de los órganos fuente y los órganos sumideros en la vid (Modificado de Lebon 2005).

A lo largo de su desarrollo, la hoja pasa por tres estados en lo que se refiere al flujo de fotoasimilados en la planta: (i) cuando la hoja está desarrollada entre 0 y 1/3 de su superficie final, ésta se comporta como un sumidero de sacarosa, (ii) entre 1/3 y 2/3 de su superficie final, la hoja es al mismo tiempo un sumidero y una fuente de glúcidos y, (iii) entre 2/3 y la totalidad de su superficie final, se convierte en la fuente exclusiva de fotoasimilados, para luego disminuir progresivamente con la edad (Carbonneau *et al.* 2007).

Como se menciona anteriormente, en las células fotosintéticas los fotoasimilados producidos en el ciclo de Calvin son exportados, principalmente en forma de triosas fosfato, desde el cloroplasto hacia el citosol, donde son utilizados en la glicólisis (luego en la respiración o en el proceso de síntesis) o transformados en sacarosa para su utilización a nivel local o su exportación hacia los tejidos sumidero.

Durante el día, el exceso de fotoasimilados es almacenado en forma de almidón en el cloroplasto. Durante la noche, el almidón almacenado en el cloroplasto o en los amiloplastos de los órganos sumidero es hidrolizado para producir azúcares solubles (maltosa y glucosa) que servirán de señales y de fuente energética en la planta. En los tejidos sumideros, la sacarosa es importada a través de un transporte simplástico (plasmodesmos) o un transporte apoplástico (a través de la pared celular) (Rolland *et al.* 2006).

Es necesario entonces que la regulación de la expresión génica y las actividades enzimáticas al interior de los tejidos y/u órganos fuente y sumidero de glúcidos estén coordinadas para asegurar la síntesis y la utilización óptima de los recursos de carbono y de energía, así como la adaptación del metabolismo del carbono a los estrés medioambientales (Rolland *et al.* 2002). En general, un nivel bajo de azúcares en la planta beneficia la fotosíntesis y la movilización de reservas, mientras que un nivel alto promueve el crecimiento y el almacenamiento de azúcares bajo la forma de almidón (Rolland *et al.* 2002; 2006).

En relación a la translocación de asimilados en la planta entera, dos estados son cruciales: (i) la floración y el cuajado provocan la aparición de las bayas como nuevos sumideros para los compuestos ricos en carbono y nitrógeno; y (ii) el envero induce una demanda muy fuerte de asimilados por parte de las uvas, una preferencia por el almacenamiento de glúcidos en detrimento del consumo inmediato de la planta, así como una eventual contribución a las reservas de la planta (Carbonneau *et al.* 2007).

El metabolismo del carbono es un proceso muy dinámico que implica fluctuaciones en las concentraciones y los flujos de azúcares a lo largo de todo el desarrollo de la planta y, por ende, es directamente perturbado por los diferentes tipos de estrés, bióticos o abióticos, que la planta debe enfrentar.

2.3.2 Importancia de los glúcidos en la floración en la Vid

En las plantas leñosas, la floración es el estado que consume la mayor cantidad de energía en un ciclo anual de desarrollo (Lebon *et al.* 2005a) puesto que las flores en desarrollo consumen más carbono que el que asimilan. Por ello son consideradas como los sumideros de carbono más importantes durante el periodo reproductor.

Una de las fuentes de fotoasimilados para las inflorescencias en desarrollo es la fotosíntesis realizada por la misma inflorescencia; sin embargo la fuente principal de azúcares es la hoja (Lebon *et al.* 2005a; 2008).

No obstante, existe igualmente una competencia entre los órganos vegetativos y los reproductores por el aprovisionamiento de azúcares. Durante los primeros estadios de desarrollo de la inflorescencia, las hojas son más eficaces que las inflorescencias para la captación de azúcares. Además, dichas inflorescencias son aún muy pequeñas para competir con las hojas ya desarrolladas y no realizan suficiente fotosíntesis para mantener su crecimiento. Esto provoca finalmente que el desarrollo de las inflorescencias sea más lento (Lebon *et al.* 2008). Es por ello que existe un efecto beneficioso cuando las hojas son cortadas de la planta (meristemas laterales) hasta que las primeras inflorescencias aparecen.

En la vid, los principales azúcares presentes en la savia bruta y elaborada y que alimentan las inflorescencias son la sacarosa, la glucosa y la fructosa (Lebon *et al.* 2008). Asimismo, aún si la sacarosa es la forma principal de azúcar transportada en la vid, al momento del desborre de la yema, son las hexosas las que se encuentran en mayor cantidad en la savia bruta (Lebon *et al.* 2004; 2008).

Estas diferencias dependen también de la cepa. Por ejemplo, en el Pinot noir, son la glucosa y la fructosa las que se presentan en mayor cantidad entre los estadios

BBCH 55 y BBCH 57 durante la meiosis femenina, mientras que en el Gewurstraminer, el almidón y la sacarosa son predominantes (Lebon *et al.* 2008).

De manera general, los efectos de los glúcidos en el desarrollo floral son complejos. En *Arabidopsis*, la floración necesita de la exportación de fotoasimilados desde la hoja así como la movilización de almidón desde las raíces, lo que implica que los azúcares presentes en el floema juegan un rol importante a lo largo del desarrollo floral (Rolland *et al.* 2002; 2006).

A nivel del ciclo fisiológico de los glúcidos de la vida, existe una transición progresiva entre dos fases: al inicio, la movilización de reservas, precisamente de almidón, desde las raíces representa la fuente principal de carbono para los órganos en desarrollo. Luego, la fotosíntesis neta soporta la continuidad del desarrollo de la planta pero también la renovación de las reservas (Lebon *et al.* 2004, 2005a, 2008) (Fig. 16). En el caso del Pinot noir, esta transición ocurre durante la meiosis femenina, lo que explica la sensibilidad de la yema floral a la disminución de la disponibilidad en glúcidos, lo que podría provocar la *coulure* de las flores.

Por esta razón, las diferencias que existen entre la fotosíntesis de las hojas y la de las inflorescencias y por ende, la disponibilidad en azúcares, juegan un rol importante en la regulación de la expresión de genes así como en la respuesta de la planta a los factores estresantes durante la floración (Lebon *et al.* 2008; Vasconcelos *et al.* 2009).

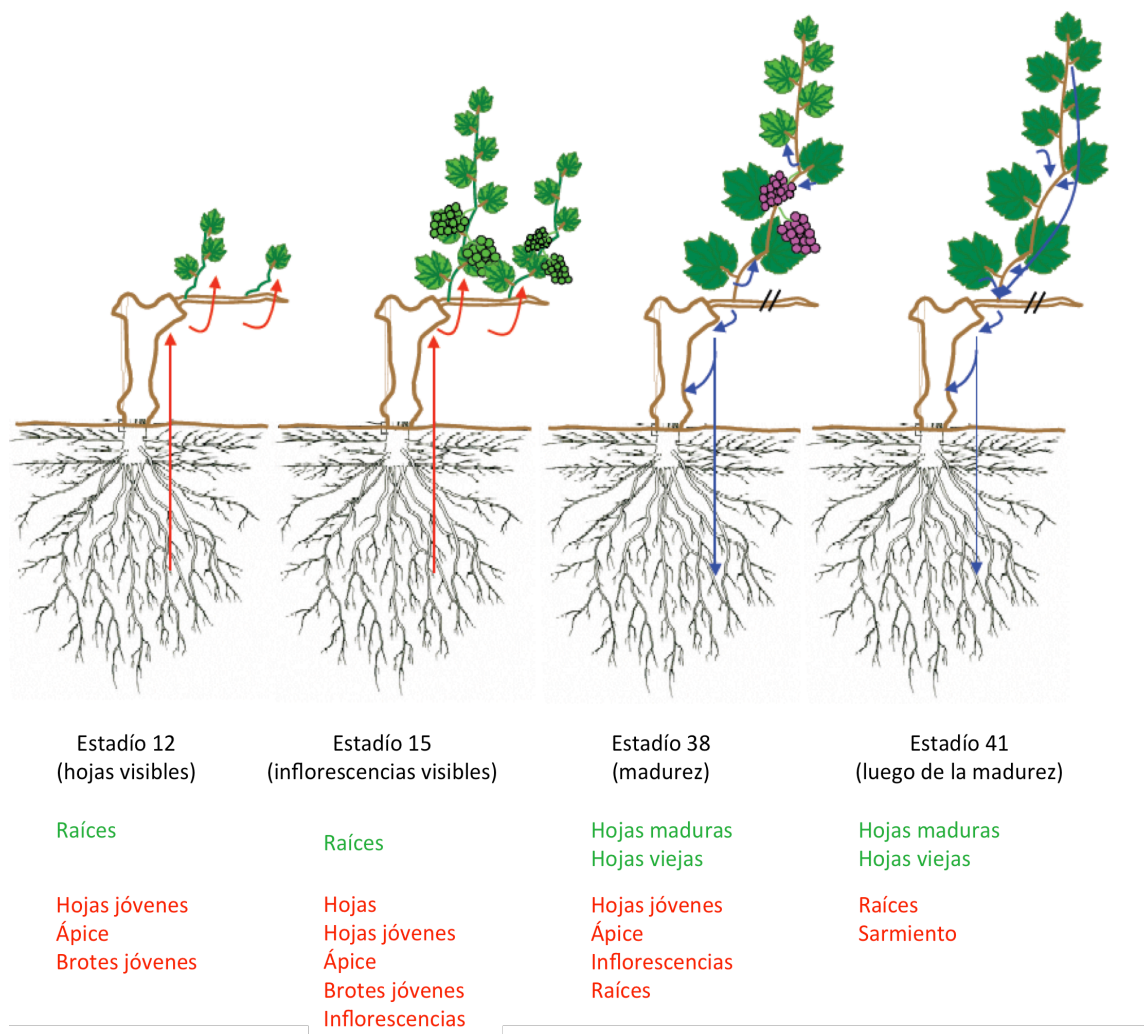


Figura 16: Esquema general de las relaciones fuente/sumidero en la vid según su ciclo anual. Las flechas rojas representan el trayecto de las reservas, y las azules, el trayecto de los fotoasimilados. Los órganos fuente se indican en verde y los sumideros, en rojo (Modificado de Lebon 2005).

2.3.2.1 Movilización de azúcares desde las reservas

Según Lebon *et al.* (2008), el almidón es la reserva de glúcidos más importante en muchas cepas de vid. Por ejemplo, en el Pinot noir, el almidón es almacenado en las raíces o en los sarmientos. Durante el invierno, el 90% del almidón de la planta es acumulado a nivel del parénquima de las raíces, representando un tercio de la masa seca de la raíz. Al inicio de la primavera, gracias al aumento de la temperatura del sol, la planta sale de su estado de latencia hiberna para retomar su metabolismo. En este momento el almidón es la única fuente de azúcares en la vid y es movilizado hacia los

tejidos vegetativos y los órganos reproductores para permitir su desarrollo. Dicha movilización de las reservas continua hasta la antesis y termina en el momento de la floración (Lebon *et al.* 2008; Vasconcelos *et al.* 2009), para luego ser nuevamente almacenadas y acumuladas hasta el inicio del envero (Fig. 17).

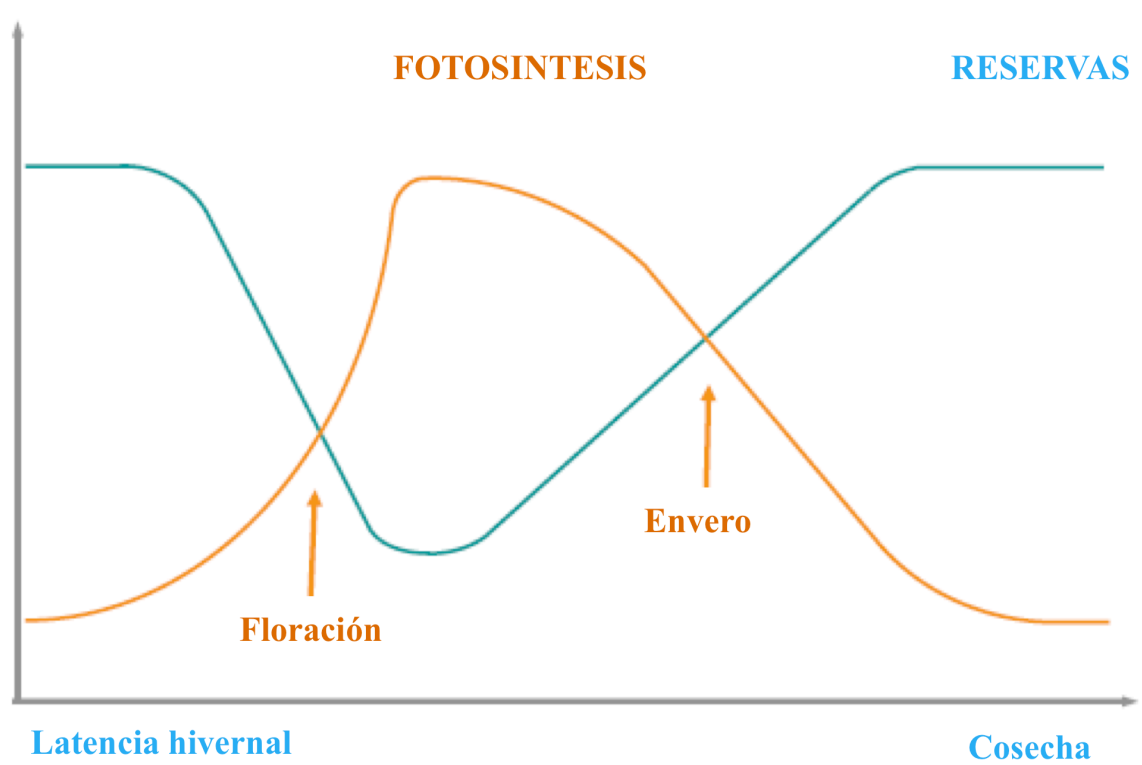


Figura 17: Fluctuaciones de las reservas y de la fotosíntesis en la vid durante un ciclo anual (Modificado de Lebon *et al.* 2008).

2.3.2.2 Fotosíntesis foliar

En la vid, la fotosíntesis y el futuro de los fotoasimilados producidos en la planta varían a lo largo de todo el año. A nivel de las hojas, la fotosíntesis aumenta desde el desborre de la yema hasta la floración, luego disminuye regularmente hasta la senescencia de la hoja (Lebon *et al.* 2008). Antes y después de la floración, la fotosíntesis llega a su máxima expresión en toda la planta.

Entre la floración y el envero, los fotoasimilados son utilizados para el desarrollo de los órganos anuales y perennes. Luego del envero, las reservas de

almidón son acumuladas en la parte leñosa de la planta y los fotoasimilados son reorientados hacia los frutos, promoviendo la maduración de las uvas. Finalmente, la senescencia de la hoja provoca la disminución de la actividad fotosintética y de la disponibilidad de fotoasimilados en la planta (Lebon *et al.* 2008).

Asimismo, es importante mencionar que existen variaciones debido a factores medioambientales, como la temperatura, que afectan la apertura de los estomas y la tasa de fotosíntesis neta de la planta (Lebon *et al.* 2008). Esto influye directamente la disponibilidad de fotoasimilados en los órganos, afectando su desarrollo especialmente durante los periodos sensibles como es el desarrollo floral.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis de la Investigación:

- En la vid *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir, la exposición a las bajas temperaturas durante una noche tiene efectos sobre los glúcidos de reserva de la inflorescencia próxima a los estadíos BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días.

3.2 Objetivo General:

- Evaluar el efecto de las bajas temperaturas durante una noche sobre los glúcidos de reserva de la inflorescencia de la vid *Vitis vinifera* L. cv. "Pinot noir" próxima a los estadíos BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días.

3.3 Objetivos Específicos:

- Obtener y cultivar ramas fructíferas de Pinot noir a nivel de laboratorio hasta el desarrollo de las inflorescencias.
- Determinar el estadio apropiado de las inflorescencias de Pinot noir (entre BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días) en la cual la meiosis femenina da lugar.
- Medir la cantidad de glúcidos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) e insolubles (almidón) presentes en la inflorescencia de Pinot noir, luego de someter las estacas a tres temperaturas bajas diferentes (4°C, 0°C y -3°C) durante una noche.
- Localizar mediante observaciones microscópicas las reservas amiláceas presentes en la inflorescencia de Pinot noir, luego de someter las estacas a una noche a -3°C.
- Evaluar el posible efecto diferencial de dichas bajas temperaturas sobre los glúcidos de reserva de la inflorescencia de la vid próxima al momento de la meiosis femenina sobre la base del contenido y la variación de los glúcidos contenidos en la inflorescencia.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material Vegetal

4.1.1 Origen del material vegetal

Para este estudio fueron utilizados sarmientos de *Vitis vinifera* L. cultivar Pinot noir, provenientes de la poda realizada durante el invierno 2010 en dos sitios de la región: (i) Reims (Departamento de la Marne): viñedo de la *Maison de Champagne “Pommery”* y, (ii) Brimont, Massy de Saint – Thiery (Departamento de la Marne): área de cultivo del agricultor Mr. Pascal Laluc.

4.1.2 Características de la Cepa

El Pinot noir es una cepa de calidad, propia de climas relativamente fríos. Presenta yemas de color blanco y hojas jóvenes de color verde claro que luego se convierten en verde oscuro en la cara exterior, y verde claro en la cara interior. Sus racimos son de talla pequeña, en general de 8 a 12 cm de largo, cilíndricos y compactos. Las uvas son pequeñas, muy ligeramente ovoides, de piel gruesa de color negro violáceo (Les Maisons de Champagnes et leur grandes Marques 2009).

Su desborre es muy precoz y su madera resiste bien a las heladas de invierno, pero la fructificación no se produce de manera adecuada cuando la floración ocurre en malas condiciones atmosféricas. Para tener éxito, este cultivar necesita de terrenos calcáreos y de un clima no muy caluroso, lo que explica que la Bourgogne y la Champagne sean sus regiones privilegiadas. Los vinos hechos con Pinot noir se distinguen por su fuerza y su consistencia, sostenidos por un buen vigor y por la fineza de su bouquet (Les Maisons de Champagnes et leur grandes Marques 2009).

4.1.3 Obtención de ramas fructíferas

La técnica que permite la obtención de ramas fructíferas fue descrita inicialmente en 1966 por Mullins (Mullins, 1966) para ser posteriormente mejorada por

otros autores (Mullins et Rajasekaran, 1981; Lebon *et al.* 2005b) (Fig. 18). El presente trabajo se desarrolló considerando estas últimas modificaciones.

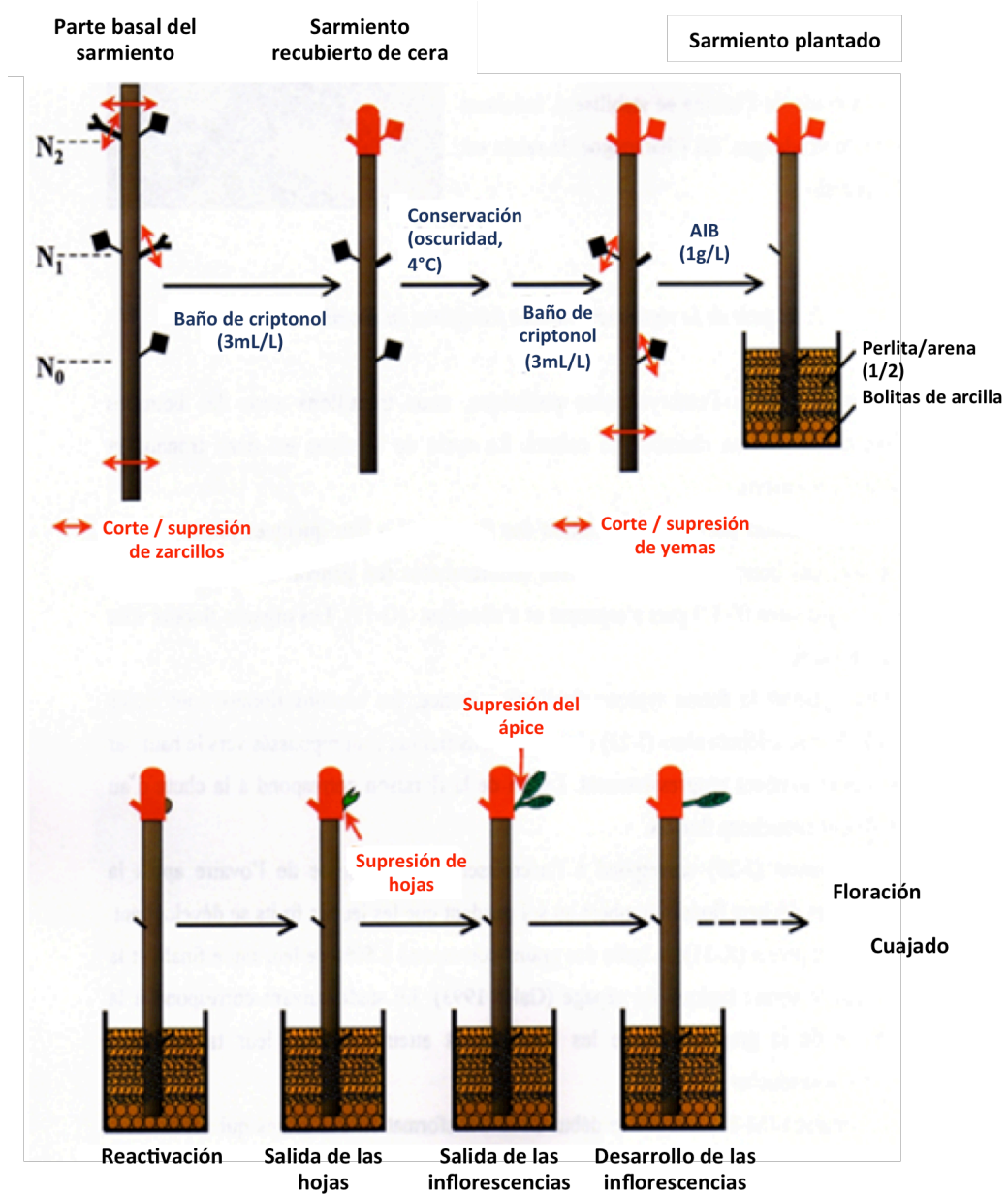


Figura 18: Obtención de ramas fructíferas (Modificado de Petit 2008).

La obtención de las estacas se realiza a partir de la parte basal de los sarmientos recolectados. Dicha parte basal se limita a tres nudos y dos entrenudos completos, donde dichos nudos deben seguir el ritmo ternario que caracteriza la disposición de los zarcillos: un nudo denominado N0 (el basal) desprovisto de zarcillo y dos nudos N1 y N2 sucesivos. Los zarcillos son eliminados y las estacas son cortadas aproximadamente a 3 cm del primer nudo (N0) y a 1 cm del último (N2).

Las estacas fueron sumergidas en un baño de criptonol líquido a 0,05 % (0,5mL de la solución comercial mezclados con 1L de agua del caño, en agitación y a 28°C durante una noche). Luego del baño, el nudo N2 fue recubierto con cera conteniendo fungicidas y hormonas de crecimiento (Rebwachs WF, Stähler Agrochemie). Las estacas fueron conservadas en cámara fría en oscuridad hasta el momento de ser utilizadas.

Para ser utilizadas, una vez de ser extraídas de la cámara fría, las estacas fueron sumergidas durante una noche en un baño de criptonol 0,05 %, a 28°C para rehidratarlas y protegerlas contra el desarrollo de hongos. Luego del baño, fueron lavadas con agua del caño para eliminar el exceso de criptonol.

A continuación, los brotes de los nudos N0 y N1 fueron cortados para evitar que compitan con el desarrollo del brote del nudo N2, y las estacas fueron cortadas una vez más 2 cm por debajo del nudo N0. Los tres primeros centímetros de la estacas (desde la parte basal) fueron sumergidos en una solución acuosa de ácido β -indol butírico (AIB) a 1g/L [100 mg de AIB en polvo diluidos en 2mL de etanol 95° y enrazar a 100mL con agua destilada. Finalmente, se agrega tres gotas de NaOH 5N] durante 30 segundos con el objetivo de favorecer la rizogénesis.

Las estacas fueron plantadas en macetas de plástico conteniendo una mezcla de perlita/arena (1/2) y de bolitas de arcilla en el fondo. La perlita y las bolitas de arcilla permiten una buena aireación de la arena y evitan el estancamiento del agua a nivel

de las raíces. Se procuró colocar dos estacas por maceta buscando que éstas tengan un aspecto similar en cuanto al tamaño y grosor.

Las macetas fueron colocadas en cámara de cultivo a una temperatura de 25°C día/19°C noche, una higrometría de 60% y un fotoperiodo de 16 horas utilizando luz artificial proveyendo de 15 000 lux (aproximadamente 200 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las estacas fueron regadas diariamente con agua del caño y una vez a la semana con el medio Lesaint, Tendille y Duménil (1971) modificado (Anexo 2). Las hojas fueron cortadas hasta que la inflorescencia apareció (se consideró que cada estaca presente sólo un máximo de cuatro hojas).

4.2 Material de laboratorio: Reactivos, equipos y otros materiales utilizados

4.2.1 Reactivos:

Kit enzimático ENZYTEC™ D-Glucose/D-Fructose/Sucrose (Scil Diagnostics GmbH, Germany); Criptonol Líquido; Dimetil Sulfóxido y Ácido Clorhídrico (DMSO/HCl); Lugol; cera conteniendo fungicidas y hormonas de crecimiento (Rebwachs WF, Stähler Agrochemie); ácido β -indol-butírico (AIB); reactivos del medio modificado de Lesaint, Tendille et Duménil(1971); Reactivos para microscopia (Glutaraldehído comercial, Tampón Fosfato, Sacarosa, Solución Tween, Ácido Osmico, Etanol de 25°, 50°, 70°, 95° y 100°; Acetona; Araldita; Ácido Peryódico de Schiff, Peróxido de Hidrogeno, Metasulfito de Sodio y Eukitt); entre otros.

4.2.2 Equipos:

Cámara fría regulable a diferentes temperaturas, Cámara de cultivo a 25°C, Centrifuga de Laboratorio; Cámara de Flujo Laminar; Congeladora a -80°C; Espectrómetro; Baño María; Máquina de Hielo; Estufa a 60°C; Micrótopo Manual; Placa Caliente para Laboratorio; Microscopio óptico BH2-RFCA OLYMPUS con cámara fotográfica U-CMAD-2 OLYMPUS y conectado a un ordenador portátil.

4.2.3 Otros:

Erlenmeyers, Vasos de precipitado, Probetas, Láminas y Laminillas, Macetas de plástico, Arena, Perlita, Bolitas de Arcilla, Nitrógeno Líquido, Morteros y Pilonés; Pipetas Automáticas y Puntas; Pinzas de Madera; Dewars y Guantes para nitrógeno líquido; Guantes de plástico; Pinzas; Tubos de Centrifuga en Polipropileno de 1.5, 15 y 50mL; Hielo troceado.

4.3 Métodos de Trabajo

4.3.1 Exposición a bajas temperaturas

Una vez las inflorescencias hicieron su aparición en las estacas, fue necesario monitorear el estadio de desarrollo de la inflorescencia utilizando la clasificación de la BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and CHemical industry) (Fig. 8, pág. 15) (Meier, 2001). Esto debido a la necesidad de trabajar con estacas en las cuales las inflorescencias hayan alcanzado el estadio de “racimos visibles con botones florales aglomerados” o estadio BBCH 55. Este estadio es de gran importancia puesto que la meiosis ovular en el Pinot noir se lleva a cabo entre BBCH 55+ 2 días y 55 + 8 días (Lebon *et al.* 2004).

Cabe recordar que si bien la bibliografía especifica que la meiosis femenina en el cultivar Pinot noir se produce entre los estadios BBCH 55 + 2 días y 55 + 8 días, en el presente estudio las inflorescencias serán monitoreadas a lo largo de su desarrollo hasta alcanzar el estadio BBCH 55 de “racimos visibles con botones florales aglomerados”, momento en el cual las plantas serán expuestas a las bajas temperaturas. Este estadio es suficiente para los análisis del estudio, puesto que se busca obtener plantas que se encuentren “próximas” al momento en el cual la meiosis ocurre.

El grupo de trabajo estuvo formado por 81 estacas que alcanzaron el estadio BBCH 55 + 2 días. Estas fueron colocadas durante una noche de 12 horas en cámara

fría a 4°C, 0°C ó -3°C de manera independiente, cubriendo la base de las macetas con cartón y algodón sintético para evitar que las raíces se enfrien. Al día siguiente, las plantas tratadas al frío fueron recolocadas en cámara de cultivo. El término “*noche fría*” puede ser utilizado para denominar las condiciones a las que las plantas son sometidas durante este estudio: una única noche de 12 horas a bajas temperaturas.

El grupo control estuvo formado por 81 estacas que se encontraban en el mismo estadio de desarrollo BBCH 55 “racimos visibles con botones florales aglomerados” que el grupo de trabajo. Las plantas control se mantuvieron en la cámara de cultivo bajo las mismas condiciones de temperatura (25°C día/19°C noche), higrometría (60%) y fotoperiodo (16 horas luz) mencionadas anteriormente.

4.3.2 *Cuantificación de glúcidos*

4.3.2.1 Cuantificación de almidón

Las inflorescencias completas a excepción del pedúnculo (es decir sólo el raquis, el pedicelo y los botones florales) (Fig. 5, pág. 11) fueron colectadas 2, 24 y 48 horas post-estrés, congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta el momento de su uso. El seguimiento se decidió hacer 2 horas post-estrés debido a la necesidad de darle un tiempo de recuperación a las estacas luego de las 12 horas a bajas temperaturas, así como a 24 y 48 horas post-estrés para evaluar la respuesta de las estacas durante un plazo de tiempo más largo.

Para la cuantificación de glúcidos, las inflorescencias fueron molidas en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y pilón limpios. Del polvo obtenido se pesó 100mg en un tubo de centrifuga de 1.5mL. Luego, se agregó 1mL de tampón fosfato de sodio 0,1M, pH 7.5, frío, la mezcla se agitó bien y luego fue centrifugada 15 minutos a 10 000 g y 4°C. El sobrenadante se recuperó en otro tubo y fue conservado en congelador a -20°C para ser utilizado en la cuantificación de glúcidos solubles. El sedimento se utilizó para la cuantificación del almidón.

A partir de este momento se trabajó en la cámara de flujo laminar. El botón fue resuspendido en 1mL de DMSO/HCl 8N (4/1 v/v). La mezcla se homogenizó con ayuda de un vórtex y, si era necesario, se utilizó una pipeta Pasteur para despegar el sedimento del fondo del tubo. Los tubos fueron incubados durante 30 minutos en baño maría a 60°C, homogenizando regularmente para mejorar la disolución del almidón. Una vez que la incubación terminó, los tubos se dejaron enfriando algunos minutos para luego ser centrifugados 5 minutos a 5 000 g y 20°C.

Para la cuantificación de almidón se utilizó alícuotas de 100µL. La alícuota se mezcló con 100 µL de una solución de Lugol (0,03% de I₂ y 0,06% de KI molidos en HCl 0,05N) y 1mL de agua destilada. La mezcla se efectuó directamente en las cubetas para espectrofotómetro, homogenizada y dejada alrededor de 15 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió a 600nm en oscuridad. Se prepararon 3 alícuotas a partir de cada muestra, y para la lectura del blanco se reemplazó los 100µL de la muestra por 100µL de DMSO/HCl 8N (4/1 v/v).

Fueron usados los valores de referencia (obtenidos a partir de la medición de concentraciones conocidas de almidón) para realizar un grafico y obtener una curva de tendencia. La calidad de la ecuación de dicha curva se verificó calculando el coeficiente de determinación (R²). Dicha ecuación de la curva se utilizó para encontrar las concentraciones de almidón en la muestra analizada, a partir de las absorbancias medidas. La concentración se presenta en porcentaje de masa fresca (% MF) en función de la masa exacta de la muestra pesada antes dla cuantificación.

4.3.2.2 Cuantificación de glúcidos solubles (Glucosa, Fructosa y Sacarosa)

Se cuantificaron la sacarosa, glucosa y fructosa debido a que son los azúcares principales en la vid (Lebon *et al.* 2004). Los azúcares de los sobrenadantes obtenidos en la etapa del molido de las inflorescencias fueron cuantificados utilizando el kit enzimático ENZYTECTM D-Glucose/D-Fructose/Sucrose (Scil Diagnostics GmbH,

Germany). Se prepararon tres reacciones (tres repeticiones) a partir de cada sobrenadante.

La cuantificación se basa en la acción de diferentes enzimas que promueven dos reacciones: (i) en la reacción de Glucosa total, la sacarosa es hidrolizada en D-glucosa y D-fructosa, en presencia de una β -fructosidasa y, (ii) en la reacción de Glucosa/Fructosa, la fructosa es fosforilada en fructosa-6-fosfato por una hexokinasa en presencia de ATP, luego la fructosa-6-fosfato es convertida en glucosa-6-fosfato por una fosfoglucoisomerasa.

Estas dos reacciones permiten obtener D-glucosa, que es posteriormente fosforilada y oxidada en presencia de NADP y una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, para obtener gluconato-6-fosfato y NADPH, H⁺. La cantidad de NADPH, H⁺ formada se determina por la lectura de la absorbancia a 340nm.

Según las especificaciones del kit, se deben medir tres absorbancias: (i) A₁, luego de la primera reacción utilizando la β -fructosidasa, el NADP y el ATP; (ii) A₂, luego de la reacción con la hexokinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; y (iii) A₃, luego de la reacción final con la fosfoglucoisomerasa. El cálculo de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó a partir de las medidas de dichas absorbancias:

$$\Delta A_{Glucosa}: A_2 - A_1$$

$$\Delta A_{Fructosa}: A_3 - A_2$$

$$\Delta A_{Sacarosa}: [(A_2 - A_1)_{Glucosa\ total}] - [(A_2 - A_1)_{Glucosa/Fructosa}]$$

Para esto, se obtiene la siguiente formula a partir de la ley de Beer-Lambert ($DO = C \times d \times \epsilon$):

$$C = (V \times MM \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000), \text{ donde:}$$

V = volumen total en la cubeta (L)

MM = masa molar (g/mol)

ε = coeficiente de extinción molar del NADPH a 340nm ($6,3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

d = ancho de la cubeta (cm)

v = volumen de la muestra (L)

Entonces:

$$C_{\text{Glucosa}} = (3,020 \times 180,16 \times \Delta A_{\text{Glucosa}}) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = 0,8636 \times \Delta A_{\text{Glucosa}}$$

$$C_{\text{Fructosa}} = (3,040 \times 180,16 \times \Delta A_{\text{Fructosa}}) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = 0,8693 \times \Delta A_{\text{Fructosa}}$$

$$C_{\text{Sacarosa}} = (3,020 \times 342,3 \times \Delta A_{\text{Sacarosa}}) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = 1,641 \times \Delta A_{\text{Sacarosa}}$$

Las concentraciones se obtienen en mg/mL y se presentan en porcentaje de materia fresca (% MF), en función de la masa exacta de la muestra pesada antes de la cuantificación.

4.3.3 Observación y localización de reservas amiláceas mediante preparaciones microscópicas

Entre 15 - 20 flores de las plantas que sobrevivieron a la *noche fría* de -3°C fueron colectadas para realizar la microscopia. Las muestras fueron sumergidas en una solución de fijación preparada a partir de glutaraldehído comercial al 25%. Esta solución contiene 1% (p/v) de glutaraldehído, de tampón fosfato 0,1 M a pH 7.2, 0.5% de sacarosa y 0.1% (v/v) de Tween 20. La fijación se realizó durante 24 horas a temperatura ambiente y en agitación.

Luego de tres lavados de 5 minutos en una solución de tampón fosfato con 0.5% de sacarosa, las flores fueron post-fijadas en una solución de tampón fosfato 0.1M a pH 7.2, de ácido ósmico 4% y 0.5% de sacarosa durante 2 horas, en oscuridad y en agitación hasta que las muestras se oscurecieron.

Las flores fueron lavadas tres veces con agua destilada durante 5 minutos para luego ser deshidratadas en una serie progresiva de alcoholes: baños de etanol a 25° ,

50°, 70°, 95° y 100° de 30 minutos cada uno, terminando con un baño final de etanol a 100° durante una noche.

Al día siguiente, se realizó un nuevo baño de etanol 100° durante una hora, para luego sumergir las muestras progresivamente en acetona: primero en una solución de etanol/acetona (1/1) durante una hora, luego en acetona pura durante una hora, dos veces seguidas.

La resina para la inclusión se constituye de 10 volúmenes de Araldita, de un volumen de bibutilftalato, de medio volumen de benzildimetilamina y de 10 volúmenes de anhídrido dodecenil succínico. Las flores fueron sumergidas posteriormente en la resina: primero en una solución de acetona/Araldita (2/1), luego de acetona/Araldita (1/2), y finalmente de Araldita pura (durante una hora cada uno), y fueron dejadas en la resina durante toda una noche. Al día siguiente, las flores fueron sumergidas en resina fresca (recién hecha) durante una hora antes de colocarlas en moldes de plástico que contienen resina nueva y se dejaron polimerizar en el horno a 60°C durante 72 horas. A la salida del horno, las muestras quedaron listas para ser cortadas.

Para realizar los cortes, un bloque de resina endurecida que contiene la muestra fue colocada en el micrótopo. El bloque de resina se orienta según el borde cortante de la cuchilla, de manera que se encuentren en paralelo. Los cortes se realizaron manualmente y fueron recuperados sobre una gota de agua con ayuda de un mondadientes y expandidos sobre una lámina de vidrio con ayuda de una placa caliente (60°C).

Inicialmente las muestras fueron coloreadas con Azul de Toluidina para poder evidenciar las diferentes estructuras que constituyen el material biológico, asimismo poder identificar las mejores muestras y los mejores cortes que posteriormente serían coloreados con ácido peryódico y el reactivo de Schiff para localizar el almidón contenido en las inflorescencias.

Para esto, los cortes fueron aclarados durante una hora en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 10 volúmenes, luego sumergidos durante 4 horas en una solución de ácido peryódico al 1% (p/v). Las muestras fueron colocadas en incubación durante 16 horas sin lavar en presencia del reactivo de Schiff, en oscuridad y finalmente sumergidas sin lavar en dos baños sucesivos de una solución de metabisulfito de sodio al 5% (p/v) durante 10 minutos. Enseguida, los cortes fueron lavados durante 5 minutos con agua del caño y luego con agua destilada. Una vez secos, los cortes fueron montados entre lámina y laminilla con el Eukitt.

Posteriormente a la coloración, las secciones fueron observadas con ayuda del microscopio óptico BH2-RFCA OLYMPUS y fotografiadas con cámara fotográfica U-CMAD-2 OLYMPUS. Al estar conectado a un ordenador, las fotos fueron mejoradas en cuanto a brillo y opacidad, igualmente ser reensambladas, en el caso de obtener fotos por partes. Este proceso se realizó usando el programa Adobe Photoshop 10.0 para Mac OS.

4.3.4 Pruebas estadísticas

El test estadístico utilizado para la cuantificación de almidón y azúcares fue el test ANOVA con probabilidades de 0,5%, 0,1% y 0.01%.

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de Glúcidos

5.1.1 Glucosa

Como se puede observar en la Fig. 19a, las concentraciones de glucosa fluctuaron entre 0.09 y 0.16% en los controles. En el caso de las plantas tratadas a 4°C durante una noche, la concentración de glucosa en las inflorescencias bajo estrés fluctuó más bien entre 0.12 y 0.16% MF. Estas concentraciones son significativamente diferentes a los controles: 2 h post-estrés, la concentración de glucosa disminuyó en 20% (0.12% MF en las plantas bajo estrés y 0.15% MF en los controles), seguido de un aumento de 78% 24 h luego de la *noche fría*. Esta tendencia continúa hasta 48 h post-estrés: la concentración de glucosa en las inflorescencias bajo estrés fue de 0.14% MF en comparación a 0.11% MF en los controles, lo que representó un aumento de 27%.

Las mismas fluctuaciones se presentaron luego de un estrés a 0°C. Dos horas post-estrés, la concentración de glucosa en las inflorescencias bajo estrés disminuyó en 18%, para posteriormente sufrir un aumento en 78% 24 h post-estrés. Sin embargo, 48 h post-estrés, se constató una disminución del 50% en la concentración de glucosa en las inflorescencias bajo estrés (0.08 % MF) en comparación a los controles (0.16% MF).

Luego de un estrés a -3°C, la evolución de las concentraciones de glucosa fue diferente de los otros dos estreses. En el caso de las inflorescencias bajo estrés, 2 y 24 h post-estrés se constató un fuerte aumento en 75 y 37.5%, respectivamente, mientras que 48 h post-estrés, la concentración de glucosa no mostró diferencias significativas en comparación a los controles.

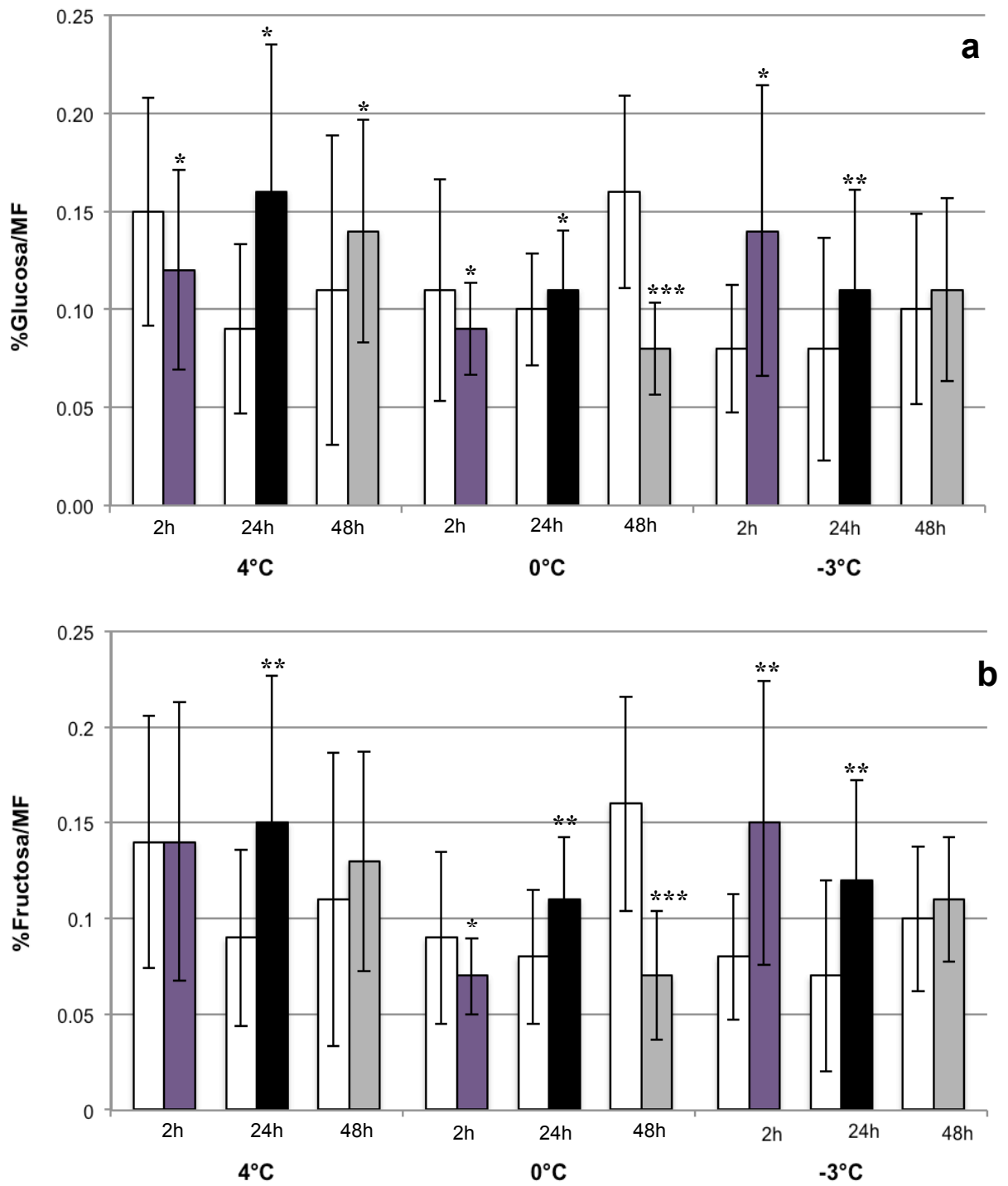


Figura 19: Expresión en porcentaje de materia fresca (MF) de las concentraciones de (a) glucosa y (b) fructosa en las inflorescencias de las plantas control (barras blancas) y de las plantas bajo estrés a 4°C, 0°C y -3°C en función del momento de evaluación post-estrés: 2 horas (barras en tonalidades moradas), 24 horas (barras en tonalidades negras) y 48 horas (barras en tonalidades grises). Los resultados significativamente diferentes se indican con una estrella ($P = 0.5\%$), dos estrellas ($P = 0.1\%$) y tres estrellas ($P = 0.01\%$).

5.1.2 *Fructosa*

En la Fig. 19b se observa que las concentraciones de fructosa en los controles varió entre 0.07 y 0.16% MF. En las plantas tratadas a 4°C, la concentración de fructosa sólo fue diferente a los controles 24 h post-estrés, donde se observó un aumento del 66% (0.09 % MF en los controles en comparación al 0.15% MF en las inflorescencias bajo estrés).

Las concentraciones de fructosa en las inflorescencias tratadas a 0°C mostraron más variaciones que aquellas obtenidas a 4°C: a 0°C la concentración en fructosa disminuyó en 20% 2h post-estrés, para luego aumentar en 37% 24 h post-estrés y finalmente disminuir en 56% 48 h post-estrés.

Finalmente, luego de un estrés a -3°C la concentración de fructosa evolucionó de la misma manera que la de glucosa puesto que 2 y 4 h post-estrés, las concentraciones aumentaron en 87.5 y 71% MF, respectivamente, mientras que 48 h post-estrés no se observaron diferencias significativas entre las plantas bajo estrés y los controles.

5.1.3 *Sacarosa*

En la Fig. 20a la concentración de sacarosa en los controles varió entre 0.24 y 0.56% MF. Luego del tratamiento a 4°C, la concentración de sacarosa en las inflorescencias bajo estrés no fueron diferentes en comparación a los controles 2 h post-estrés. Sin embargo, 24 y 48 h post-estrés, se pudo constatar un aumento del 37.5 y 34.3%, respectivamente.

Esta misma tendencia no se registró luego del tratamiento a 0°C, donde se presentaron variaciones a partir de 2 h post-estrés. Se observó una disminución del 17% en la concentración de sacarosa de las inflorescencias bajo estrés 2 h post-estrés, luego un aumento de casi 20% 24 h post-estrés y posteriormente una segunda disminución del 48% 48 h post-estrés.

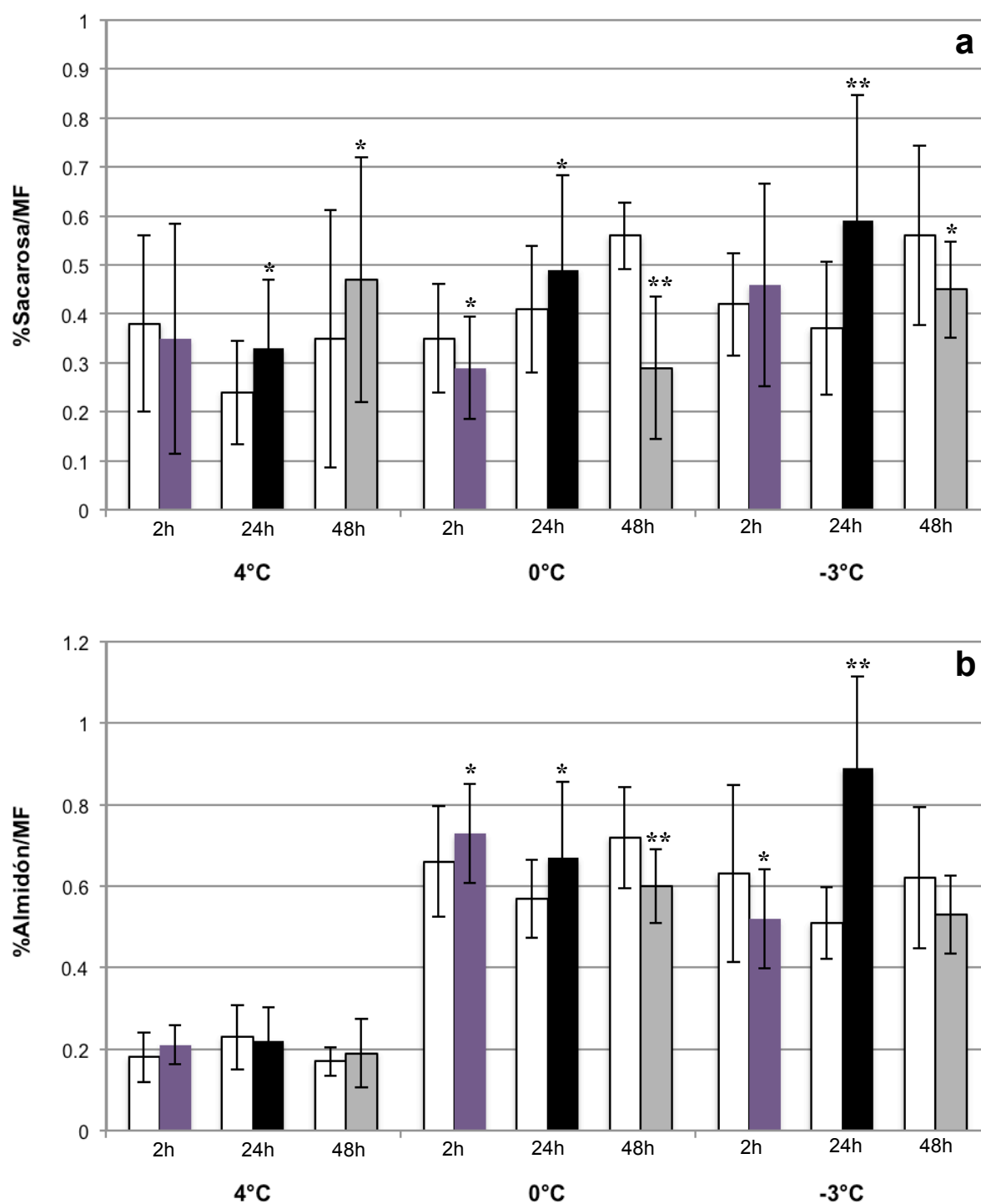


Figura 20: Expresión en porcentaje de materia fresca (MF) de las concentraciones de (a) sacarosa y (b) almidón en las inflorescencias de las plantas control (barras blancas) y de las plantas bajo estrés a 4°C, 0°C y -3°C en función del momento de evaluación post-estrés: 2 horas (barras en tonalidades moradas), 24 horas (barras en tonalidades negras) y 48 horas (barras en tonalidades grises). Los resultados significativamente diferentes se indican con una estrella (P = 0.05%), dos estrellas (P = 0.01%) y tres estrellas (P = 0.001%).

Finalmente, la evolución de la concentración de sacarosa en las inflorescencias bajo estrés luego del tratamiento a -3°C fue diferente a las anteriores: 2 h post-estrés, la concentración de sacarosa no mostro diferencias significativas en comparación a los controles, 24 h post-estrés se observo un aumento de casi 60% y 48 h post-estrés, una disminución del 20%.

5.1.4 Almidón

En la figura 20b se hace necesario resaltar las diferencias globales que se presentaron entre los valores de las concentraciones de almidón de los controles y las inflorescencias bajo estrés a 4°C , 0°C y -3°C . Mientras que a 4°C las concentraciones se mantienen alrededor de 0.2% MF, éstas aumentan fuertemente en los tratamientos a 0°C (entre 0.60 y 0.72% MF) y a -3°C (entre 0.51 y 0.89% MF). Por esta razón las concentraciones de almidón variaron ampliamente entre 0.17 y 0.72% MF.

En el caso de las plantas que sufrieron un estrés a 4°C , las concentraciones de almidón no mostraron diferencias significativas en comparación a los controles. Por el contrario, en el tratamiento a 0°C sí hubieron diferencias: 2 y 24 h post-estrés se observó un aumento del 10.6 y 17.5%, respectivamente; mientras que 48 h post-estrés se constató mas bien una disminución del 16%.

En las plantas que pasaron el tratamiento a -3°C la concentración de almidón disminuyó 2 h post-estrés, luego aumentó en 74.5% 24 h luego de la *noche fría* y finalmente, 48 h post-estrés, no se observaron diferencias significativas en comparación a los controles.

5.2 Observación y localización de reservas amiláceas

La Fig. 21 muestra los resultados preliminares de la localización de las reservas amiláceas en la inflorescencia de la vid.

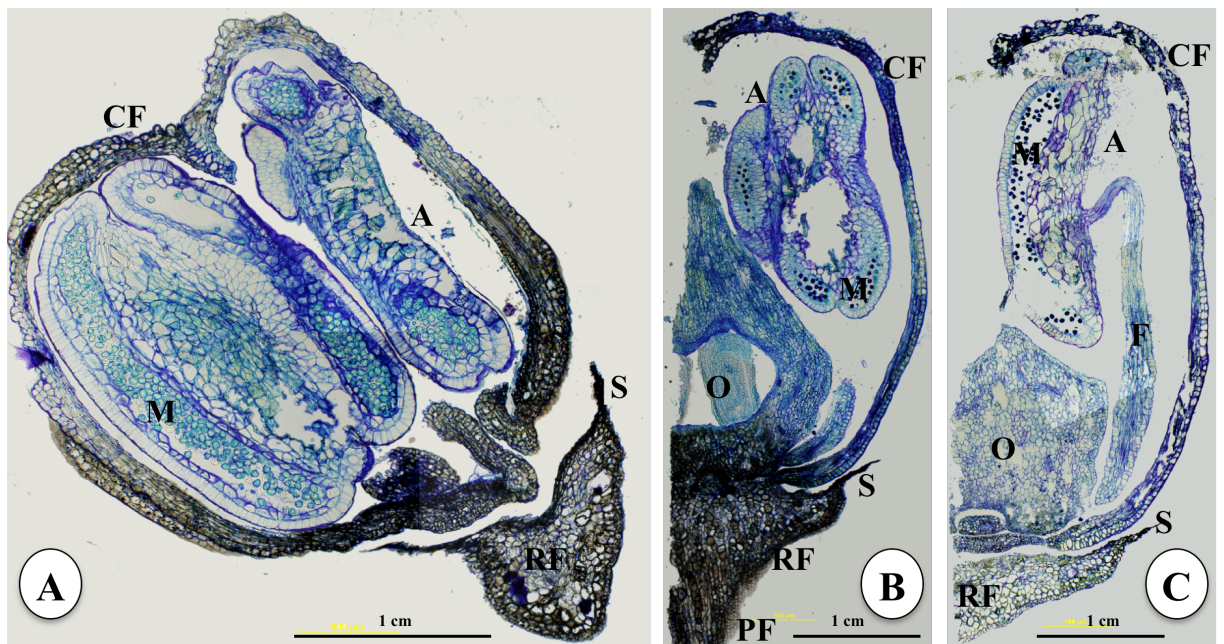


Figura 21: Secciones longitudinales de las inflorescencias (A) control y (B), (C) bajo estrés a -3°C , entre los estadios BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días, coloreadas con azul de toluidina para poner en evidencia las estructuras que forman parte de dichas inflorescencias. A = antera; CF = capucha floral; F = filamento; M = microsporas; O = ovario; PF = pedúnculo floral; RF = receptáculo floral; S = sépalo.

La primera etapa del protocolo fue de utilizar el colorante azul de toluidina para evidenciar las diferentes estructuras que forman parte de las inflorescencias en los controles y las plantas bajo estrés a -3°C . Se pudieron observar estructuras como la capucha floral que rodea y protege las estructuras reproductoras, los estambres formados por las anteras que contienen las microsporas, el ovario, el receptáculo floral, el pedúnculo floral y los sépalos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas esperadas entre los controles y las plantas bajo estrés a través de esta coloración.

Por ello se vio la necesidad de continuar con la segunda parte del protocolo, para lo cual se utilizó la coloración del ácido peryódico de Schiff pudiéndose evidenciar claramente las reservas de almidón contenidas en las inflorescencias, reflejada por una coloración rosácea, cuyos resultados preliminares se muestran en la Fig. 22, que

es la reconstrucción de la imagen a partir de una serie de fotos tomadas a diferentes zonas de la inflorescencia.

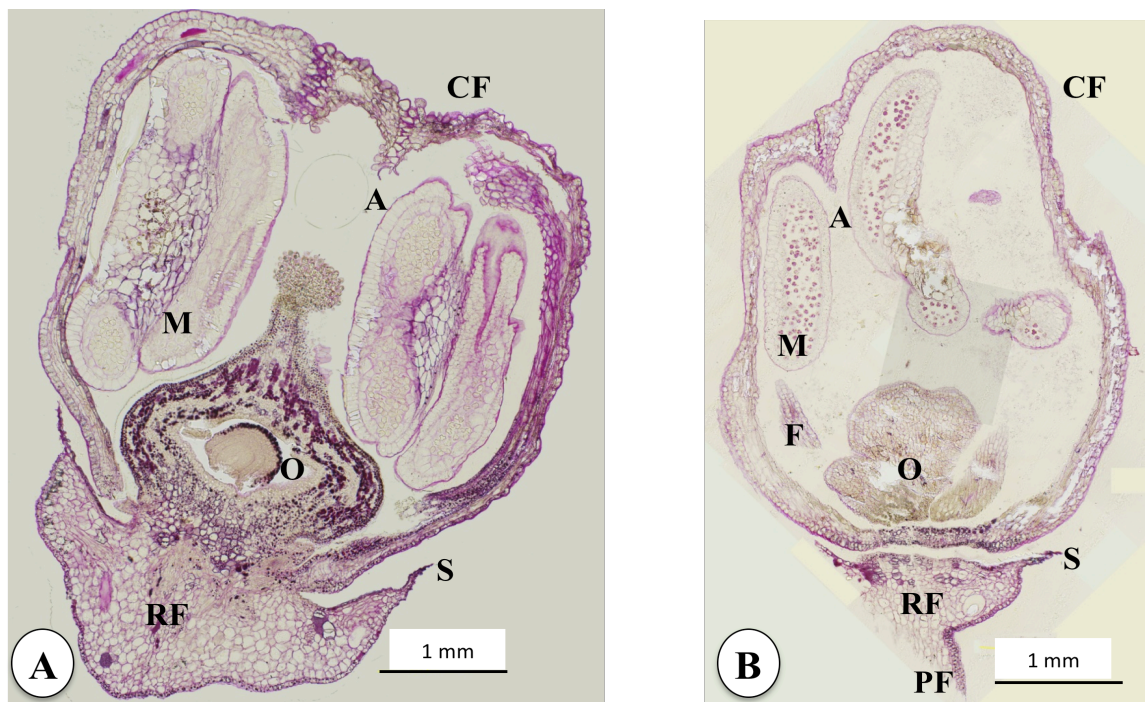


Figura 22: Secciones longitudinales de las inflorescencias (A) control y (B) bajo estrés a -3°C , entre los estadíos BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días, coloreadas al ácido peryódico de Schiff para poner en evidencia las reservas amiláceas contenidas en dichas inflorescencias. A = antera; CF = capucha floral; F = filamento; M = microsporas; O = ovario; PF = pedúnculo floral; RF = receptáculo floral; S = sépalo.

Se pudo evidenciar una diferencia de las reservas de almidón en ciertas zonas de las inflorescencias de los controles y de las plantas bajo estrés. Como se esperaba, en las muestras control la coloración rosácea pudo verse tanto en órganos estériles tales como el receptáculo floral (especialmente a nivel de la epidermis) y los sépalos, así como en los órganos reproductores: las anteras y el ovario. En el caso de las muestras sometidas a un estrés de -3°C , si bien existieron semejanzas en cuanto a la presencia de almidón en los órganos estériles de la misma manera que en los controles, sí se encontraron diferencias en las microsporas, donde la coloración rosácea es más fuerte en comparación con los controles y, por el contrario, a nivel del ovario, dicha coloración es más débil.

6. DISCUSION

6.1 De la importancia y la variabilidad de las reservas en glúcidos de las estacas

Se conoce la importancia de los glúcidos en la vida a lo largo de su desarrollo, especialmente en relación al establecimiento y éxito de su desarrollo reproductor. Efectivamente, las reservas de glúcidos contenidas en la madera y principalmente en las raíces ejercen su influencia en el potencial de rendimiento de los viñedos (Vasconcelos *et al.* 2009). Además, la inducción floral requiere la movilización del almidón y la exportación de los glúcidos desde las hojas hacia el meristemo apical (Rolland *et al.* 2006).

Asimismo, Lebon *et al.* 2004 mostraron que los glúcidos contenidos a nivel de las inflorescencias varían según el estadio de desarrollo de los órganos masculinos y femeninos. En el caso de los órganos femeninos, es posible que las anomalías a nivel de ovarios y la necrosis a nivel de óvulos serían provocadas por fenómenos estresantes (como las temperaturas bajas) sufridas durante la meiosis y que comprometen el metabolismo del carbono normal de la planta.

En el presente estudio es importante mencionar la gran variabilidad individual encontrada en lo que concierne al contenido de glúcidos en las estacas. Efectivamente, ya sean los controles o las muestras sometidas a estrés, las estacas mostraron variaciones que podrían deberse a una cantidad inicial de reservas diferente en las estacas trabajadas.

Sin embargo, en este estudio, se intentó minimizar esta variación lo más posible, al plantar y evaluar la respuesta de las estacas que presentaban un espesor similar con el fin de homogenizar dicha cantidad inicial de reservas en la madera. A pesar que solamente el 10% de las reservas de la vida se encuentran justamente en la madera (el resto se localiza en las raíces), las estacas que desarrollaron estructuras reproductivas no mostraron un desarrollo de las raíces.

Asimismo, la importancia de la forma de recolección de las estacas utilizada en este estudio es preponderante y no debe ser dejada de lado. Lebon *et al.* (2005b) mencionan que los sarmientos que producen estacas son de gran importancia sobre todo en lo que concierne a las reservas, puesto que si se colectan sarmientos provenientes de cualquier parte de la planta, las estacas tendrán contenidos en glúcidos variables, lo que aumentará la variabilidad reproductiva y, por ende, los resultados de la experiencia no serán explotables.

Además, se conoce que la concentración de los glúcidos cambian considerablemente a lo largo del desarrollo y sobre todo como respuesta a factores medioambientales (Rolland *et al.* 2006). Por ende, no es sorprendente encontrar variaciones (ya sea a 2, 24 y 48 horas) en las plantas control.

6.2 De la cuantificación de glúcidos

En general, los resultados presentados en este estudio son similares a los de Jeanson (2010). Efectivamente, en lo que concierne a la glucosa y la fructosa, las cantidades halladas en los controles (0.07 y 0.16% MF) se encuentran alrededor de los mismos valores de Jeanson (2010) (0.05 y 0.20% MF) para las dos hexosas, y un poco más elevadas para la sacarosa (0.24 – 0.56% MF en este estudio, frente a 0.15 – 0.55% MF según Jeanson (2010)). En lo que al almidón se refiere, las cantidades se encuentran entre los 0.17 y 0.72% MF, datos más elevados que los reportados por Jeanson (2010) (0.15 – 0.5% MF), lo que se debería a la preparación y la utilización de diferentes valores de referencia para la última cuantificación de almidón.

6.2.1 Respuesta a un estrés de 4°C

La respuesta de la planta frente a un estrés de 4°C es similar a aquella encontrada por Jeanson (2010). Debido a que ni la cantidad de almidón ni de sacarosa muestran diferencias significativas en comparación con el control 2 horas post-estrés y que, si además, la concentración de glucosa disminuye, sería lógico pensar que: i) se

genera un consumo elevado de la glucosa a nivel de la inflorescencia, ó *ii*) se produce una reducción en la biosíntesis de glucosa. Jeanson (2010) afirma que dicha disminución se debería más que todo a una reducción en la síntesis de glucosa a través de la fotosíntesis. Además hay que notar que existen fluctuaciones a las 24 y 48 horas post-estrés. Si bien la concentración de almidón no cambia, se observó un aumento de sacarosa, glucosa y fructosa a partir de las 24 horas, lo que se explicaría ya sea por un restablecimiento progresivo de la fotosíntesis, o al aporte de glúcidos hacia la inflorescencia como fue propuesto por Jeanson (2010), quien considera que solamente podría haber una movilización de glúcidos al no haber encontrado aumento en la asimilación neta de CO₂ en 24 horas. Sin embargo, se piensa que para que existan al mismo tiempo concentraciones elevadas de sacarosa así como de sus productos hidrolíticos (glucosa y fructosa), sería necesario no sólo una movilización de reservas hacia la inflorescencia sino que también una síntesis de sacarosa que mantendría dicha concentración elevada a pesar de su conversión progresiva en las dos hexosas.

Inversamente a lo que sucede con la cantidad de glucosa, la evolución de la concentración en fructosa no fue la misma que la encontrada por Jeanson (2010) para una *noche fría* a 4°C. Efectivamente, la concentración en fructosa no mostró diferencias a las 2 y 48 horas post-estrés. La única diferencia se encontró a las 24 horas post-estrés, observando un aumento del 37% en dicha concentración. Lo anterior no parece ser coherente. Sería más lógico esperar que la evolución de las concentraciones en glucosa y fructosa fuera similar puesto que ambas hexosas son productos de la hidrólisis de la sacarosa.

6.2.2 *Respuesta a un estrés de 0°C*

En el caso de un estrés a 0°C, si bien los valores de la concentración en almidón son más elevadas que aquellas encontradas por Jeanson (2010) es

importante mencionar que su evolución sigue la misma tendencia: hay una movilización rápida de reservas hacia la inflorescencia que explicarían el aumento de la concentración en almidón a 2 y 24 horas post-estrés. En el caso de la concentración en glúcidos solubles, 2 horas post-estrés, la sacarosa se mantiene similar al control mientras que se presenta una disminución de la glucosa y la fructosa. De la misma manera que en la experiencia a 4°C, dicha disminución se debería a un consumo de las hexosas ó a una disminución de su síntesis. Esta movilización continuaría 24 horas post-estrés, aumentando no sólo las concentraciones en glucosa y fructosa, si no también aquellas de la sacarosa. Finalmente, 48 horas post-estrés, la baja en la concentración en almidón estaría relacionada a la disminución en las concentraciones en glúcidos solubles.

6.2.3 Respuesta a un estrés de -3°C

En lo que se refiere a la respuesta de la planta frente a un estrés a -3°C, los resultados mostraron diferencias con respecto a Jeanson (2010). Para empezar, observamos una disminución en la concentración de almidón a 2 horas post-estrés, mientras que la concentración en sacarosa no mostró variaciones y las de glucosa y fructosa mostraron por el contrario un fuerte aumento. Esto implicaría que un estrés a -3°C sería suficiente para que (i) la planta comience a utilizar las reservas de almidón contenidas en la inflorescencia, y (ii) que su conversión rápida en sacarosa, y posteriormente en glucosa y fructosa, explicaría las concentraciones elevadas de dichas hexosas. Luego, 24 horas post-estrés, una movilización de reservas externas a la inflorescencia explicaría el aumento de las concentraciones en almidón, sacarosa, glucosa y fructosa. Finalmente, la planta alcanzaría un estado cerca de “la normalidad”, puesto que para todas las concentraciones en glúcidos no se observaron diferencias en comparación a los controles.

Es importante mencionar que la acumulación de glúcidos solubles en las células sirve como protección contra el frío. Efectivamente, un aumento de la concentración en glúcidos solubles a nivel intracelular conduce al aumento de la presión osmótica y promueve la disminución del punto de congelación del medio celular. Esto evita la formación de cristales de hielo al interior de las células y sobre todo a nivel intra-membranal que podrían provocar daños en las células (Lebon 2005). Debido a eso se esperaría que luego de una *noche fría*, se encontraran concentraciones elevadas en glúcidos solubles en la vid 2 horas post-estrés. Para las temperaturas de 4 y 0°C, se constató una reducción de la concentración en glúcidos solubles (glucosa y/o fructosa), e incluso no se observaron diferencias con respecto a los controles. Sin embargo, en lo que se refiere al tratamiento a -3°C, el efecto del frío es evidente: se observó un aumento fuerte de las concentraciones en glucosa y fructosa, algo que no se presenta a temperaturas superiores. Esto confirmaría que un estrés a -3°C es suficiente para activar y desencadenar respuestas rápidas y fuertes en la vid que permitirían hacer frente a una baja de temperaturas durante la noche.

En el maíz, se ha sugerido que cuando el metabolismo del carbono se encuentra disminuido por bajas temperaturas, la energía absorbida por la hoja está en exceso. Esto conduce a una fuerte acumulación de radicales superóxido e hidroxilo que generarían efectos negativos a nivel de las membranas fotosintéticas y, posteriormente, fenómenos de foto-inhibición que comprometerían el equilibrio fisiológico de la planta (Massacci 1995). Esto se podría producir también en la vid. En el caso de plantas que sufren un estrés debido al frío entre los estadios BBCH 55 y BBCH 57, especialmente a nivel de tejidos sensibles como las inflorescencias, es posible hipotetizar la producción de radicales libres por las células, desencadenando fenómenos de apoptosis, y generando la muerte de algunas plantas justo al final del estrés a -3°C (en promedio, tres plantas de cada diez, *resultados no mostrados*).

6.3 De la observación y localización de reservas amiláceas

Ebadi *et al.* (1995b) mostraron que cuando los óvulos son expuestos a temperaturas de 12°C día/9°C noche, dos días antes de la floración y durante una semana, dichos óvulos sufren una desaceleración en su desarrollo y pueden presentar anomalías. Los resultados de la coloración con azul de toluidina, por ser preliminares, no ponen en evidencia anomalías o diferencias entre los controles y las inflorescencias que sufrieron un estrés a -3°C. Sin embargo, los resultados de la coloración al ácido peryódico de Schiff evidenciarían una fuerte disminución en las reservas de almidón presentes en el ovario de las inflorescencias de la vid, luego de una noche de exposición a -3°C.

Lebon *et al.* (2004) mencionan que en el cultivar Pinot noir, durante el estadio BBCH 55 + 2 días, las reservas de almidón están presentes en el endotecio de las anteras (estadio de microspora juvenil); mientras que en el ovario (estadio de célula madre de la macrospora) no hay presencia de almidón. Durante el estadio BBCH 55 + 8 días, las reservas de almidón en las anteras son abundantes en el endotecio, en el septum y las microsporas (estadio de microspora vacuolada); mientras que en el ovario tanto la macrospora como la nucela contienen almidón (estadio de célula madre del saco embrionario).

Si bien en el caso del presente trabajo se presentan diferencias a nivel del contenido de almidón de las microsporas de las inflorescencias sometida a un estrés de -3°C, esto se debe a que nuestras inflorescencias analizadas por microscopía se encontraban en un estadio un poco más avanzado que el de la muestra control. Esto puede determinarse porque es evidente de la Fig. 22 que, mientras las microsporas de la muestra control aun se encuentran juveniles, las microsporas de las inflorescencias bajo estrés se encuentran ya en estado vacuolado. Lo anterior permitiría establecer un estadio próximo al BBCH 55 + 2 días para las muestras control y un estadio próximo al

BBCH 55 + 8 días para las plantas bajo estrés. Esto estaría de acuerdo con el hallazgo de almidón en las microsporas de las inflorescencias bajo estrés.

Si bien se podría pensar que esta diferencia en el estadio de las inflorescencias control y las sometidas a estrés no permitiría un buen análisis y comparación de los resultados, esto es erróneo. Siempre y cuando se tome en cuenta el detalle de la diferencia en el estadio de las inflorescencias y sobre donde deberíamos encontrar reservas de almidón según dicho estadio, la comparación puede realizarse.

Gracias a esto, es válido aseverar que los resultados de las reservas de almidón encontradas en las microsporas de las inflorescencias bajo estrés corresponden a lo esperado según el estudio de Lebon *et al.* (2004). El caso de las reservas de almidón contenidas en el ovario es, sin embargo, diferente. Conociendo que en el estadio BBCH 55 + 8 días la presencia de almidón en la macrospora y la nucela es importante (Lebon *et al.* 2004), la Fig. 22B no estaría de acuerdo con los resultados esperados normalmente: es posible observar una fuerte reducción de la cantidad de almidón de reserva.

Este hallazgo corroboraría los resultados de cuantificación de glúcidos vistos anteriormente y haría más fuerte la hipótesis de la activación de una respuesta rápida de la vid y la correspondiente utilización de los glúcidos de reserva de la inflorescencia de la vid, sobre todo de aquellas contenidas en el ovario, al momento de hacer frente a un estrés abiótico como el que implica la exposición a una temperatura de -3°C durante una noche.

6.4 Del efecto global de un estrés a “-3°C”

En base a lo mencionado anteriormente, el efecto de una *noche fría* a -3°C sobre la fisiología de la planta, y más específicamente, sobre los glúcidos de reserva de la vid, es evidente.

Durante una *noche fría* a -3°C , la sacarosa sería convertida rápidamente en glucosa y fructosa, razón por la cual las concentraciones en dichas hexosas aumentan dos horas post-estrés y no aquella en sacarosa. Además, un periodo de 24 horas es suficiente para que la planta regrese a las condiciones normales de concentración en almidón. La presencia de dicho almidón en las inflorescencias de la vid ayudara a la planta a hacer frente al estrés debido al frío. Ya ha sido mostrado que el óvulo del cultivar Pinot noir presenta reservas de almidón entre los estadíos BBCH 55 y 57 y que jugaría un rol en la respuesta de la planta al estrés (Lebon 2005).

Sin embargo, esta temperatura es un factor de “vida o muerte” para la planta porque, o bien las plantas mueren justo al finalizar la *noche fría*, ó salvo aquellas que sobreviven tienen la capacidad de regresar a un estadio casi normal 48 horas post-estrés. Esto puede ser comparado con las fluctuaciones causadas por un estrés a 0°C : puesto que éstas se estacan 48 horas post-estrés, esto implicaría que si bien el efecto de esta temperatura no es tan fuerte, se necesitaría más tiempo para que las plantas regresen a la normalidad, sobre todo en el caso de aquellas que no son tan resistentes (aquellas que en el caso de una *noche fría* a -3°C , probablemente morirían).

7. CONCLUSIONES

- De manera general, se comprobó que una exposición a bajas temperaturas (0°C y 3°C) durante una noche tiene efectos negativos sobre los glúcidos de reserva de la inflorescencia de la vid próxima a los estadíos BBCH 55 + 2 días y BBCH 55 + 8 días.
- Una noche fría a 4°C provoca fluctuaciones ligeras en las concentraciones de glúcidos en la vid pero que continúa siendo una temperatura no suficientemente estresante.
- Una noche fría a 0°C permite más bien una movilización rápida de las reservas de almidón presentes en la inflorescencia.
- Una noche fría a -3°C induce la utilización inicial de las reservas de almidón acumuladas en las inflorescencias.

8. RECOMENDACIONES

8.1 Sería necesario hacer muestreos de las inflorescencias antes, durante y después de la *noche fría*. Esto tendría por objetivo hacer un seguimiento de la evolución de las concentraciones en glúcidos no solamente después del estrés pero (i) justo antes de entrar a la *noche fría*, para conocer el estado en el cual la planta ingresa a la *noche fría*, y (ii) durante el estrés, para observar la evolución al mismo tiempo que el frío estaría ejerciendo su efecto sobre los glúcidos.

8.2 Igualmente, sería interesante analizar las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono como la sacarosa fosfo-sintasa, la sacarosa sintasa, las α - y β -amilasas y la almidón sintasa, así como las invertasas citosólicas y parietales que jugarían un rol importante en la comprensión de las variaciones en las concentraciones en glúcidos frente a un estrés causado por el frío. Efectivamente, la cantidad de cada glúcido presente en los diferentes niveles de organización de un organismo es el resultado de un equilibrio metabólico entre las actividades de las enzimas que sintetizan y que degradan cada glúcido (Lebon 2005), a lo largo del desarrollo de las flores de la vid (Lebon & Clément 2005a). Asimismo, la base de toda respuesta y variabilidad intrínseca de cada especie, cultivar y planta se encuentra a nivel de sus genes. Por ello, sería de gran utilidad evaluar los genes que están implicados en la fotosíntesis, y sobre todo en el metabolismo del carbono, como aquellos genes que codifican para las enzimas mencionadas anteriormente.

8.3 El cultivo Pinot noir es conocido por su resistencia a la *coulure* y por ello su utilización en el presente estudio. Sin embargo, sería interesante evaluar el efecto de una *noche fría* sobre otros cultivares, esta vez sensible a la *coulure* para determinar si las concentraciones en glúcidos sufrirían fluctuaciones aun más marcadas que las vistas en el cultivar resistente.

8.4 Como lo sugiere Jeanson (2010), sería obligatorio (i) verificar las temperaturas entre 0 y -3°C para llegar a determinar la temperatura límite en la cual los efectos del frío comienzan a percibirse y (ii) analizar temperaturas más bajas para constatar si las respuestas observadas a -3°C se acentuarían. De la misma manera, para establecer una relación directa entre un estrés frío y la *coulure*, sería interesante ampliar el estudio más allá de la floración y hasta el cuajado para analizar si la tasa de *coulure* sería más elevada que en las plantas control.

8.5 Finalmente, teniendo en cuenta lo enunciado por Lebon (2005) que menciona que se debe tener en cuenta que las ramas fructíferas pueden ser utilizadas como modelo simplificado de la vid para estudiar ciertos parámetros, el estudio de la presencia de almidón en los óvulos no pueden ser realizados bajo dicho modelo. De esta afirmación se desprende la necesidad de comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con aquellos obtenidos en los viñedos. Sería entonces necesario realizar más repeticiones así como intentar estudiar la respuesta frente a una *noche fría* a nivel del viñedo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALLEN D J & ORT DR. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *TRENDS in Plant Science*. 2001, vol 6, n° 1, p.36-42.

ARCHER E & SWANEPOEL JJ. Bud fertility of grapevines and factors determining it. *Deciduous Fruit Grower*. 1987, vol 3, p.101-105.

BAGIOLLINI M. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Suisse d'Agriculture et d'Arboriculture*. 1952, vol.8, p. 4-6.

BERTAMINI M, MUTHUCHELIAN K, RUBINIGG M, ZORER R & NEDUNCHEZHIAN N. Low-night temperature (LNT) induced changes of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005, vol. 43, p.693–699.

BUENA VIDA. 2009. Anatomía y Fisiología de la Vid. Disponible en Internet:

<http://www.buenavida.com.mx/2009/03/anatomia-y-fisiologia-de-la-vid/>

CALLEJAS R, GALLEGUILLOS M, BENAVIDES C. Pérdidas de producción por fallas en la fecundación, competencia y anormal desarrollo de las bayas en Vid vinífera. [Artículo de Extensión del Centro de Estudio de la Vid]. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 2004. Disponible en Internet:

<http://www.uchilecrea.cl/difusion/articulos/CorrimientoMillarandageRCR.pdf>

CAMA – Cumbres Andinas Mendoza Argentina. Historia de la vid en el viejo mundo. Argentina. 2011. Disponible en Internet:

http://www.mendoza.travel/Vinos_mendoza_viejomundo.aspx

CARBONNEAU A, DELOIRE A ET JAILLARD B. La vigne. Physiologie, terroir, culture. Paris : Dunod ; 2007. Pp. 442.

CARMONA MJ, CUBAS P, CALONJE M & MARTINEZ-ZAPATER JM. Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Canadian Journal of Botany*. 2007, vol. 85, p. 701-711.

CARMONA MJ, CHAÏB J, MARTINEZ-ZAPATER JM & THOMAS MR. A molecular perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany*. 2008, vol. 59, n° 10, p. 2579-2596.

CENTRO DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA VITIVINÍCOLA (CITEvid). La uva y el Pisco: Potencialidades productivas. 2004. Pp. 11, 20. Disponible en Internet: http://www.conapisco.org.pe/pdfs/libro_la_uva_y_el_pisco.pdf

CERVERA A. Los Apuntes: Cepas viejas y prefiloxéricas. [Artículo de la Revista Todovino]. Madrid. 2009. Disponible en Internet: <https://www.hoyvino.com/content/cepas-viejas>

CHAMPAGNOL F. Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale. Montpellier : Dehan ; 1984. Pp.352.

CLICHE M. La Culture de la Vigne. Conférence présentée à la Société d'horticulture et d'écologie du nord de Montréal. Institut de technologie agro-alimentaire de Saint-Hyacinthe. Ecological Agriculture Projects. 1969. Disponible en Internet: http://eap.mcgill.ca/CPG_1_F.htm

CLÉMENT C. 2010. Physiologie de la Reproduction chez les Angiospermes. Cours BPV802. Université de Reims Champagne-Ardenne.

COÏC EC & LESANT C. Comment assurer une bonne nutrition en eau et éléments minéraux en horticulture. *Horticulture Française*. 1971, vol. 8, p. 11–14.

COMITE INTERPROFESSIONNEL DU VIN DE CHAMPAGNE. Le Champagne en quelques chiffres - 2009. Disponible en Internet: <http://www.champagne.fr>

EBADI A, MAY P, SEDLEY M & COOMBE BG. Effect of low temperature near flowering time on ovule development and pollen tube growth in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), cvs Chardonnay and Shiraz. *Australian Journal of Plant Sciences*. 1995b, vol. 157, n° 6, p. 703-712.

EDUCATION A L'ENVIRONNEMENT. 2010. La vigne. Disponible en Internet:

http://environnement.ecole.free.fr/Vin/vigne_vin.htm

EICHHORN KW & LORENZ DH. Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. Nachrichten des Deutschen Pflanzenschutzdienst Deutsche. *Weinbau*. 1977, vol. 29, p. 119-120.

FLEXAS J, BADGER M, CHOW BS, MEDRANO H & OSMOND CB. Analysis of the relative increase in photosynthetic O₂ uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. *Plant Physiology*. 1999, vol. 121, p. 675–684.

FRANCEAGRIMER. Filière vin, cidre, plants de vigne. Le cycle végétatif de la vigne - 2010. Disponible en Internet: <http://www.onivins.fr/index.asp>

GERRATH JM. Developmental morphology and anatomy of grape flowers. *Horticultural Review*. 1993, vol.13, p. 315-337.

HEBRARD C. Embryogenèse pollinique chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). [Rapport de Stage]. Université de Reims Champagne – Ardenne, Reims, 2006.

HUGLIN P. Biologie et écologie de la vigne. Paris : Payot Laussane ; 1986. Pp. 372.

INSTITUT FRANÇAIS DE LA VIGNE ET DU VIN. Les stades phénologiques de la vigne - 2009. Disponible en Internet: www.vignevin.com

JEANSON E. Effet d'une nuit froide sur l'équilibre physiologique de l'inflorescence de la vigne (*Vitis vinifera*) cv. 'Pinot noir'. [Mémoire de Master]. Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 2010.

LANGELLIER F. Météo. *Le Vigneron Champenois*. 2002, vol. 9, p. 14-18.

LANGELLIER F, DOLEDEC AF, PANIGAI L. Météo 2003 : l'année de tous les dangers. *Le Vigneron Champenois*. 2003, vol. 9, p. 20-33.

LEBON G. Importance des glucides lors de la floraison chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). Exemples de cépages présentant une sensibilité différente à la coulure. [Thèse doctorale]. Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 2005.

LEBON G & CLEMENT C. Changes in enzyme activities of carbohydrate metabolism during the development of grapevine (*Vitis vinifera* L.) flowers. *Planta* (soumise), 2005a.

LEBON G, DUCHÊNE E, BRUN O & CLÉMENT C. Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany*. 2005b, vol. 95, p. 943–948.

LEBON G, DUCHÊNE E, BRUN O, MAGNÉ C & CLÉMENT C. Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction*. 2004, vol. 17, p. 71-79.

LEBON G, DUCHENE E, MAGNE C & CLEMENT C. Photosynthesis of the grapevine (*Vitis vinifera*) inflorescence. *Tree Physiology*. 2005a, vol. 25, p. 633–639.

LEBON G, WOJNAROWIEZ G, HOLZAPFEL B, FONTAINE F, VAILANT-GAVEAU N & CLÉMENT C. Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Journal of Experimental Botany*. 2008, vol. 59, n° 10, p. 2565-2578.

LES MAISONS DE CHAMPAGNE ET LEUR GRANDES MARQUES. Culture de la Vigne, Cépages - 2009. Disponible en Internet: <http://www.maisons-champagne.com>

LISSARRAGUE JR. Morfología de la Vid (*Vitis vinifera* L.). Open Course Ware. Universidad Autónoma de Madrid. 2010. Disponible en Internet: <http://ocw.upm.es/produccion-vegetal/viticultura/contenidos>

LISSARRAGUE JR Y BAEZA P. Biología de la Vid. Open Course Ware. Universidad Autónoma de Madrid. 2010. Disponible en Internet: <http://ocw.upm.es/produccion-vegetal/viticultura/contenidos>

MASSACCI A, LANNELLI MA, PIETRINI F & LORETO F. The effect of growth at low temperature on photosynthetic characteristics and mechanisms of photoprotection of maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 1995, vol. 46, p. 119-127.

MEIER U. Grapevine. In: U Meier (eds) Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry: Blackwell Wissenschafts-verlag, Berlin, 2001. Pp. 93-95.

METEO FRANCE. Climat en France - 2010. Disponible en Internet : <http://france.meteofrance.com>

MULLINS MG. Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature*. 1966, vol. 209, p. 419-420.

MULLINS MG & RAJASEKARAN K. Fruiting cuttings: Revised method for producing test plants of grapevine cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1981, vol. 32, p. 35-40.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). 2010. Disponible en Internet: <http://www.oiv.org/>

PEASON P, LOUVEAUX J. Pollinisation et productions végétales : Pollinisation de la Vigne. Editions Quae. 1984. Pp. 181-185. Disponible en Internet : <http://books.google.fr>

PETIT AN. Effets de fongicides anti-*Botrytis* sur les organes végétatifs et reproducteurs de la vigne. [Thèse]. Université de Reims Champagne – Ardenne, Reims, 2008.

ROLLAND F, BAENA-GONZALEZ E & SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2006, vol. 57, p. 675-709.

ROLLAND F, MOORE B & SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*. 2002, p. S185-S205.

STITT M & HURRAY V. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002, vol. 5, p.199–206

SRINIVASAN C & MULLINS MG. Physiology of flowering in the grapevine – A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1981, vol. 32, n° 1, p. 47-63.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Base de données en ligne]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. 2010. Disponible en Internet: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genform.pl>

VASCONCELOS MC, GREVEN M, WINEFIELD CS, TROUGHT MCT & RAW V. The Flowering Process of *Vitis vinifera*: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2009, vol. 60, n° 4, p. 411-434.

VELÁSQUEZ MH. La Producción de la Uva en el Perú. [Monografía]. 2008. Disponible en Internet : www.monografias.com

WIKIPEDIA, The Free Encyclopedia. Photosynthesis. 2010. Disponible en Internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis>

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1 : Codificación BBCH de los estadios fenológicos de la vid (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) (Meier 2001)

Código	Descripción
Estadio principal 0. Brotación	
00	Letargo: las yemas de invierno, de puntiagudas a redondeadas, marrón brillante u oscuro según la variedad; escamas de las yemas cerradas, de acuerdo con la variedad
01	Comienzo del hinchado de las yemas; los botones empiezan a hincharse dentro de las escamas
03	Fin del hinchado de las yemas: yemas, hinchadas, pero no verdes
05	"Estadio lanoso"; lana marrón, claramente visible
07	Comienzo de la apertura de las yemas: ápices foliares verdes, apenas visibles
09	Apertura de las yemas: ápices foliares claramente visibles
Estadio principal 1. Desarrollo de las hojas	
11	Primera hoja, desplegada y fuera del brote
12	2 hojas, desplegadas
13	3 hojas, desplegadas
15	Los estadios continúan hasta ...
19	9 o más hojas, desplegadas
Estadio principal 5. Aparición del órgano floral	
53	Inflorescencias, claramente visibles
55	Inflorescencias hinchándose; las flores apretadas entre sí
57	Inflorescencias, desarrolladas completamente; flores separándose
Estadio principal 6. Floración	
60	Los primeros capuchones florales, separados del receptáculo
61	Comienzo de la floración: alrededor de 10 % de capuchones caídos
62	Alrededor de 20 % de capuchones caídos
63	Floración temprana: alrededor de 30 % de capuchones caídos
64	Alrededor de 40 % de capuchones caídos
65	Plena floración: alrededor de 50 % de capuchones caídos
66	Alrededor de 60 % de capuchones caídos
67	Alrededor de 70 % de capuchones caídos
68	Alrededor de 80 % de capuchones caídos
69	Fin de la floración

Estadio principal 7. Formación del fruto

71	Cuajado de frutos; los frutos jóvenes comienzan a hincharse; los restos florales perdidos
73	Bayas del tamaño de un perdigón, los racimos comienzan a pender
75	Bayas de tamaño guisante (arvejas); los racimos, colgantes
77	Las bayas comienzan a tocarse
79	Todas las bayas de un racimo se tocan

Estadio principal 8. Maduración de frutos

81	Comienzo de la maduración; las bayas comienzan a brillar
83	Las bayas, brillantes
85	Ablandamiento de las bayas
89	Bayas, listas para recolectarse

Estadio principal 9. Comienzo del reposo vegetativo

91	Después de la vendimia; fin de la maduración de la madera
92	Comienzo de la decoloración foliar
93	Comienzo de la caída de las hojas
95	Alrededor de 50 % de las hojas caídas
97	Fin de la caída de las hojas
99	Partes cosechadas

10.2 Anexo 2: Medio de Lesaint, Tendille et Duménil (1971) modificado

Para preparar 5 litros del medio Lesaint, Tendille et Duménil (1971):

1. Colocar 2L de agua destilada en un matraz de 3L.
2. Agregar los **macro-elementos** (en el orden establecido, uno por uno hasta la disolución total del polvo).
3. Posteriormente, agregar los **micro-elementos**: 5mL para una solución x2 y 10mL para una solución x4.
4. El **Fe-EDTA**: 0,5mL para una solución final x2 y 1 mL para una solución x4.
5. Transferir en el recipiente de 5L donde se almacenara el medio, completar el volumen hasta 5L y agitar.
6. No olvidar diluir 2 o 4 veces el medio al momento de su utilización.

Macro-elementos (para 5L)

		x2	x4
Nitrato de potasio	KNO_3	1,93 g	3,86 g
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	0,80 g	1,60 g
Sulfato de magnesio cristalizado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,93 g	1,36 g
Fosfato bipotásico	K_2HPO_4	0,25 g	0,52 g
Nitrato de calcio cristalizado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,66 g	7,32 g
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	0,55 g	1,10 g

Micro-elementos (solución madre de 1 L x1000)

Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	2,0 g/L
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
Ácido bórico	H_3BO_3	1,5 g/L
Molibdato de amonio	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g/L

11. GLOSARIO

Alternisépalo(a): Que está dispuesto de manera alterna a los sépalos.

Androceo: Verticilo floral masculino de las plantas fanerógamas, constituido por uno o más estambres.

Agostamiento: Proceso por el cual el pámpano, de naturaleza herbácea, se convierte en sarmiento, de naturaleza lignificada.

Anlagen: Estructura meristemática formada por los primordios indeterminados que darán origen posteriormente a los primordios de las inflorescencias o de los zarcillos.

Antesis: Apertura de las flores.

Baya: Tipo de fruto carnoso con semillas rodeadas de pulpa; p. ej., el tomate y la uva.

Bráctea: Hoja que nace del pedúnculo de las flores de ciertas plantas, y suele diferir de la hoja verdadera por la forma, la consistencia y el color.

Cáliz: Verticilo externo de las flores completas, casi siempre formado por hojas verdosas y más a menudo recias. Conjunto de sépalos.

Carpelo: Hoja transformada para formar un pistilo o parte de un pistilo.

Coulure: Accidente que padece la vid en la época de la florescencia cuando, por efecto del frío, del viento o de la lluvia, se imposibilita o entorpece la fecundación y resultan los racimos desmedrados o sin fruto. Traducción francesa de “corrimiento”.

Corola: Segundo verticilo de las flores completas, situado entre el cáliz y los órganos sexuales, y que tiene por lo común vivos colores. Conjunto de pétalos.

Corrimiento: Véase “coulure”.

Cuajado: Desarrollo del fruto.

Dicasio: Inflorescencia cimosa o cerrada en la que, por debajo del eje principal, el cual termina en una flor, se desarrollan dos ramitas laterales también terminadas en flor.

Estípula: Apéndice foliáceo colocado en los lados del pecíolo o en el ángulo que este forma con el tallo.

Dehiscencia: Acción de abrirse naturalmente las anteras de una flor o el pericarpio de un fruto, para dar salida al polen o a la semilla.

Desborre: Primera manifestación del crecimiento de la yema.

Dialipétalo(a): (1) Dicho de una corola: Que tiene los pétalos libres, no soldados entre sí. (2) Dicho de una flor, como el alhelí, el rosal, la amapola y otras muchas: Que tiene la corola de esta clase.

Envero: Color que toman las uvas y otras frutas cuando empiezan a madurar. Época de coloración de la uva.

Esqueje: Tallo o cogollo que se introduce en la tierra para reproducir la planta.

Filotaxia: Modo de disposición de las hojas a lo largo del tallo.

Gineceo: Verticilo floral femenino de las plantas fanerógamas, constituido por uno o más carpelos, que forman el pistilo.

Inflorescencia: Forma en que aparecen colocadas las flores en las plantas.

Meristemo: Tejido embrionario formado por células indiferenciadas, capaces de originar, mediante divisiones continuas, otros tejidos y órganos especializados.

Opositifolio: Que está dispuesto de manera opuesta a la hoja.

Pámpano: Sarmiento verde, tierno y delgado, o pimpollo de la vid.

Parral: Viña que se ha quedado sin podar y cría muchos vástagos.

Vaso manchego: Sistema de poda libre frecuente en España. La planta queda baja, la cabeza con brazos definidos, la poda es muy corta, el porte rastrero, la densidad de cepas y de yemas es baja y hay una cobertura del 40-60% / 80%.

Zarcillo: Cada uno de los órganos largos, delgados y volubles que tienen ciertas plantas y que sirven a estas para asirse a tallos u otros objetos próximos.